

L'ASSICURAZIONE DI QUALITÀ NEL LABORATORIO

Il Controllo di Qualità

Dott. Salvo Reina Eurobiol

* * *

Istituto di Microbiologia, Scuola di Medicina, Università di Genova
Dir. Prof. Eugenio Debbia

Sommario

Assicurazione di Qualità e CQ	4
Imprecisione	4
L'accuratezza	5
Selezione dello Staff e formazione	6
Strumentazione e vetreria: il LABware	6
<i>Volumi pipettati fissi</i>	7
<i>Pipettamenti ripetuti</i>	7
<i>Strumentazione semi-automatica</i>	7
<i>Diluizioni manuali</i>	7
Manutenzione e test della strumentazione	8
Automazione	10
L'Acqua di laboratorio	11
Acqua purificata	11
Metodi di purificazione dell'acqua	11
Valutazione della purezza dell'acqua	12
Controllo di Qualità sui Campioni	14
Raccolta dei campioni.	14
La centrifugazione.	15
Conservazione del campione.	15
Preparazione dei Controlli e dei Reagenti	16
Controllo di Qualità del Saggio di Laboratorio	17
Precisione intra-saggio.	17
La precisione inter-saggio	18
<i>Preparazioni commerciali di controllo.</i>	18
<i>Kit commerciali del produttore.</i>	20
Programma interno di CQ.	21
Fogli di lavoro per i controlli	21
Shewart/levey-Jennings control chart	23
Westgard Analysis	26
CuSum Chart	26
Parametri per il CQ oltre i controlli	28
Schema di CQ esterno	29
Nota conclusiva	30

Introduzione

L'obiettivo del programma di Assicurazione di Qualità ("Quality Assurance") in un laboratorio è quello di assicurare un pannello di parametri e di misurazioni di riferimento per laboratori di clienti, siano essi studi veterinari, clinici o di ricerca.

Il supporto di una buona informazione di diagnostica qualitativa è essenziale perchè porta ad una stessa riduzione della sofferenza e dei periodi di trattamento di di pazienti, influenzando sulla ottimizzazione e l'obiettività; in ultima analisi tratta il miglioramento di un circolo virtuoso che

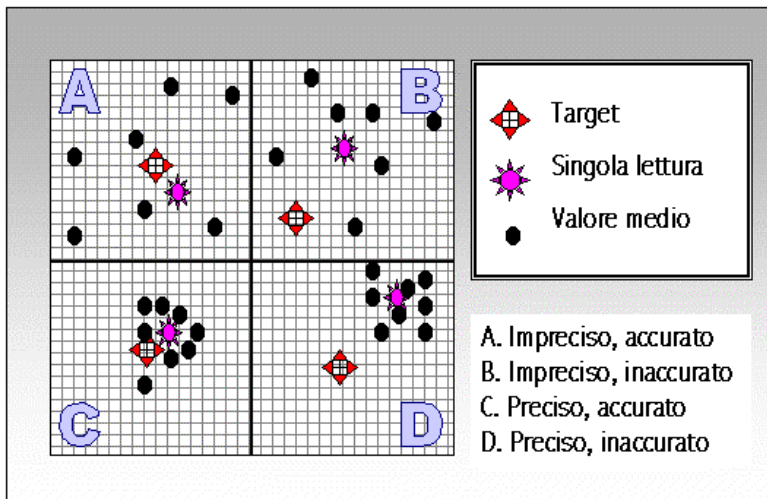
riduce i macro costi della salute pubblica. Un programma di Assicurazione della Qualità (QAP) dovrebbe includere :

- la pianificazione di formazione e training di personale tecnico selezionato;
- una attento monitoraggio della strumentazione;
- un audit periodico dei test e dei campionamenti di acqua purificata e;
- il Controllo di Qualità dei saggi.

Sebbene per questa ridotta trattazione cercheremo di investigare soprattutto il Controllo di Qualità (CQ), e addirittura solo un tipo specifico di controllo, non è possibile prescindere da una escursione introduttiva su tutta l'Assicurazione di Qualità. Peraltro, affrontando una materia estesa e articolata in modo graduale, è molto proficuo seguire un ordine di astrazione maggiore sulla tematica.

Assicurazione di Qualità e CQ

Il termine Assicurazione di Qualità (Quality Assurance, QA), viene usato per descrivere una ampia serie di attività il cui scopo è quello di prevenire problemi di affidabilità e qualità intervenendo in modo sistematico sulla Precisione e sulla



Accuratezza (Precision/Trueness & Accuracy ISO8412 "Definition and Terminology") . Molto andrebbe detto sui concetti di Precisione e Sicurezza, ma in questa sede basti dire che tutta la nomenclatura delle norme internazionali di Total Quality Management (ISO, BSI, HACCP vedi Bibliografia), indicano e definiscono i termini esatti di Precisione e Accuratezza (Precision & Accuracy) per le statistiche del Controllo di Processo (Statistical Process Control, SPC). Naturalmente, il controllo di processo è un concetto di generale applicabilità, ma di fatto nel nostro caso può essere ricondotto anche alla attività di un laboratorio; ossia, il fornire un responso piuttosto che fabbricare una auto, non muta il significato di concetti quali attendibilità, affidabilità o efficacia di processo (prodotto o servizio che sia) sulla base della verifica della qualità.

Il Controllo di Qualità (CQ) descrive i test e i metodi che si devono applicare ad ogni saggio per verificarne la validità dei risultati, e nel nostro caso il monitoraggio assiduo della precisione nel CQ dei saggi EIA/ELISA; per ogni saggio immunologico è utile conoscere la precisione, il range ottimale di valori di tolleranza (interni ed esterni, e la distribuzione e l'andamento dei coefficienti di variazione (CV) in funzione delle concentrazioni (antigeni e/o anticorpi).

Imprecisione

L'imprecisione è dovuta a errori casuali impliciti nel saggio che producono diverse misurazioni a parità di campione che, se rappresentate su un grafico di dispersione, mostrano una famiglia di punti che si pongono intorno ad uno valore medio. Se la precisione è buona c'è poca variazione. Se la precisione è scarsa l'operatore deve fidarsi meno dei suoi numeri all'interno della seduta, quindi dovrà disporre di più determinazioni grazie alle quali poter, ad esempio, valutare meglio la concentrazione di un analita sulla base, per l'appunto, di un valore medio.

L'accuratezza

L'accuratezza (o se preferite la mancanza di bias inteso come disturbo di fondo alla misura) è sostanzialmente la "prossimalità" della media di una serie di valori ad un valore di riferimento (target value); essa dipenderà evidentemente dalla assenza di errori sistematici.

Sebbene sembri su base di raziocinio fin troppa l'ovvietà dello schema del Controllo di Qualità, purtroppo questa può essere fortemente compromessa (o semplicemente ignorata) dalla componente umana di imprecisione e inaccuratezza; più esplicitamente, la componente di professionalità e competenza degli operatori deve seguire il livello di metodologia adeguato alla affidabilità delle misure, pena l'introduzione di un bias esterno al sistema di misura (non quantificabile). Pertanto, un buon CQ implica anche una competenza ed una formazione per la qualità da parte degli operatori, quindi poniamo nelle prossime righe una attenzione particolare all'aspetto dello staff.

Selezione dello Staff e formazione

Lo staff (gruppo di lavoro interno al laboratorio), è la componente fortuita esterna al test, occorre quindi identificare e selezionare persone in grado di agire precisamente.

L'esperienza, ovviamente rappresenta un merito, ma tecnici che non abbiano mai lavorato in un determinato laboratorio prima, siano stati da poco assunti o che coltivino hobbies che implicano l'uso di precisa manipolazione, hanno in questi indicatori una forte predisposizione al miglioramento, cioè esattamente ciò che serve alla Qualità. Naturalmente se il tempo lo permettesse, già durante la selezione bisognerebbe poter provare l'attitudine al saggio immunologico.

Un Programma di Assicurazione di Qualità deve comunque prevedere un periodo di affiancamento per il nuovo personale. Il programma di formazione deve essere proceduralizzato (scritto e registrato) e deve mettere il formante nelle condizioni di avere una buon excursus di tutti i saggi svolti in un laboratorio e tutti i passi di gestione, incluso le fasi di revisione autocritica e audit interni al laboratorio.

Tra gli stadi diversi deve essere stabilito un percorso di priorità non necessariamente in base a ordine di difficoltà, piuttosto sulla base di tipologia di test, non permettendo di proseguire ad un passo successivo se il formante non ha convincentemente superato il precedente.

Un adeguato programma di CQ dovrebbe includere la formazione, la valutazione periodica e l'aggiornamento di tutto il personale prescindendo dalla anzianità. In particolare, la competenza dovrebbe essere seguita periodicamente ed essere ricondotta a punteggi di merito proceduralizzati; una semplice iniziativa potrebbe comportare un semplice quiz multiplo su argomenti della letteratura, o l'incarico periodico a ruotazione ad un operatore che svolge un resoconto agli altri, incluso il supervisore di laboratorio, in occasione di un journal club.

Strumentazione e vetreria: il LABware

Numerosi parametri critici e svariate variabili operative posso essere utilizzate come indicatori di bontà dell'operato e stima delle componenti strumentali e/o delle vetrerie; basti ricordare come la sensibilità per alcuni test riguardi misure di nmoli di analita in volumi e diluizioni per i quali potrebbe certamente essere discriminante qualunque parametro fisico-chimico anche

ambientale. Ad ognuno dei fattori bisognerebbe dedicare tempo e spazio adeguati, ma in questa sede ne commentiamo brevemente un elenco paradigmatico:

Volumi pipettati fissi

I volumi da 100uL fino 25uL, di acqua o siero che siano, dovrebbero essere pipettati 10 volte ciascuno. Un volume di 25uL di riferimento dovrebbe essere testato con una soluzione tracciante radioattiva e nota che viene pipettata 20 volte per avere un riferimento di precisione e accuratezza interno all'operazione. Per ciascun volume tutti i pipettamenti sono fatti con lo stesso puntale, in modo da eliminare variazioni dovute alle punte. La precisione confrontata dovrebbe avere un CV minore dell'1% con una accuratezza tra il 99% e 101%. Ovviamente quei laboratori in cui non si svolgono saggi radioattivi dovrebbero applicare analoga tecnica di controllo ai saggi colorimetrici. Con questa monografia trovate un esempio di tabella riassuntiva per un test svolto per misurare precisione e accuratezza di pipettatori ("Immuno Assay Handbook: laboratory Management"; vedi letteratura).

Pipettamenti ripetuti

Una serie di pipettamenti con volumi differenti (es. 1000, 500 e 100uL), dovrebbero essere condotti con soluzioni a differente viscosità quali un controllo radioattivo o una soluzione di PEG (Polyethylene Glycol). Per volumi minori di 500uL un puntale dovrebbe essere usato con una siringa per aumentare la precisione dispensando campioni ad esempio (es. puntali Eppendorf su siringhe Combitip). La precisione dovrebbe essere migliore dello 0.5% del CV

Strumentazione semi-automatica

La verifica di dispensatori semi-automatici dovrebbe essere condotta con 10 duplicati di un controllo per una quantità di volumi variabili. Analogamente per saggiare l'efficienza di diluizione si prediluisce il controllo 1/10 con acqua. La precisione risultante dovrebbe essere superiore allo 0.5% del CV.

Diluizioni manuali

Il saggio di controllo per le diluizioni manuali può essere condotto in due modi differenti: diluizioni seriali e/o serie di diluizioni.

- Per diluizioni seriali si diluiscono 1 in 2 soluzioni a partire da una soluzione madre fino alla diluizione 1/32: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. In duplicato da ciascuna diluizione si pipettano 100uL; la precisione delle medie dei duplicati dopo la moltiplicazione dei fattori di diluizione dovrebbe risultare superiore al 2% del CV.
- Per serie di diluizioni tre prime diluizioni sono fatte da una soluzione madre: 1/2, 1/3, 1/5. Queste vengono ulteriormente diluite da 1/4, 1/18, 1/6, 1/9 e 1/10; la precisione delle medie dei duplicati dopo la moltiplicazione dei fattori di diluizione dovrebbe risultare superiore al 2% del CV

Manutenzione e test della strumentazione

E' molto importante che la funzionalità e le prestazioni della strumentazione e delle vetrerie in un laboratorio (si allude a pipettatrici, dispensatori, diluitori e quant'altro semiautomatico), vengano mantenute e sottoposte a un numero di test per la precisione e l'accuratezza pari a quello svolto per le componenti umane di manipolazioni; ciascuno degli strumenti andrebbe testato nelle seguenti circostanze:

Quando uno strumento o un accessorio dello strumento è introdotto, ad esempio un nuovo puntale o una nuova serie di punte;

Quando uno strumento è riparato prima di ritornare nella routine;

Quando uno strumento suscita perplessità o decada nelle prestazioni rispetto al suo standard.

I metodi che sono usati per il controllo di qualità della strumentazione sono gli stessi di quelli descritti in precedenza al riguardo dello staff e per la selezione di nuovi tecnici di laboratorio. Ci sono tuttavia 3 fattori addizionali che bisognerebbe considerare nelle stazioni di pipettamento automatico:

carry-over,

*diluizione di un campione dalla soluzione di sistema e
differenti viscosità tra sieri campione e calibratori.*

Carry-over . Il carry-over di un pipettatore automatico viene valutato grazie alla determinazione di più campioni su una piccola concentrazione di soluto versus un ampio e dinamico range di valori per parametri patologici noti (es.: gonadotropina corionica umana, hCG, alfafetoproteina, AFP, antigene di superficie dell'epatite B, HBsAg). Quando bassi valori danno risultati più alti di quelli determinati manualmente il sospetto del carry-over è fondato. Dovremmo notare che il carry-over non può essere controllato semplicemente pipettando dell'acqua ad es. dopo una soluzione radioattiva; questo perché per dimostrarlo, le diluizioni dovrebbero essere determinabili fino a 1:40.000 e su un ampio range di parametri. Sappiamo che esiste nella realtà una variabilità notevole da saggio a saggio, così ad esempio nel caso del hCG sopra citata in alcuni test ha per una non gravida un cutoff a 5mIU/ml e un valore di picco a 200.000 mIU/ml. Se il carry-over è presente dovrebbe consentire una conta significativamente più alta del valore di fondo di un contatore, ad esempio 30 colpi al minuto; ma per avere un significativo conteggio più alto di quello di fondo alla diluizione 1:40.000 il conteggio del controllo dovrebbe avere almeno 1.200.000 colpi per minuto, molto al di là del range di lavoro ordinario e lineare dei contatori in commercio (1.000.000 di colpi per minuto). Pertanto questa misura non è credibile ed è importante riuscire a valutare il carry-over con liquidi simili a quelli esaminati nella routine, ossia nella maggior parte dei laboratori dovremmo usare campioni di siero di controllo in cui si possa evidenziare il carry-over relativo ad alcune proteine. Le proteine certamente influenzano la viscosità del liquido e con essa la adesione dell'analita alle superfici del sistema tubolare dell'equipaggiamento.

La diluizione. La diluizione di un campione a partire dalla soluzione di un sistema viene saggiata con 10 duplicati di siero umano successivamente pipettati a partire da una soluzione radioattiva di controllo. La diluizione della soluzione di sistema è comprovata quando la conta nel tubo diminuisce progressivamente con la sequenza di diluizioni.

La viscosità. L'influenza di una differente viscosità viene controllata confrontando la concentrazione di siero di un determinato analita manualmente rispetto alla procedura automatica. Una differente viscosità infatti può portare differenti risultati e una conseguente inaccuratezza.

Prescindendo dal peso e dalla valutazione di ognuno dei singoli fattori sopraindicati, il controllo di una strumentazione automatica andrebbe condotto giornalmente sia per la precisione che per la accuratezza. Un gamma-counter, un lettore colorimetrico, un fluorimetro, o un densitometro devono essere valutati regolarmente. Le temperature di congelamento e scongelamento vanno anch'esse considerate almeno una volta alla settimana così lo scongelamento dovrebbe avvenire tra i 2°C e gli 8°C e il congelamento sotto i -10°C.

Automazione

Ci sono un numero di sistemi interamente automatizzati che si usano per i saggi immunologici. In questi strumenti ci sono una serie di componenti meccanici, elettrici e di trattamento del liquido esaminato tutti suscettibili di contaminazione e incremento del carry-

over. Alcuni componenti, come ad esempio le connessioni elettriche, lo sono indirettamente perchè ad esempio se danneggiati possono modificare la temperatura e l'umidità all'interno dello strumento.

L'Acqua di laboratorio

Acqua purificata

Un laboratorio dovrebbe possedere una continua fonte di acqua purificata. L'acqua corrente in nessun modo potrà essere usata in alternativa e dovrebbe essere purificata, esente da potenziali contaminanti prima di poter rappresentare uno standard adeguato anche solo per il lavaggio della vetreria. Svariati sono i contaminanti che possono essere presenti nell'acqua corrente: sia inorganici che organici, allo stato gassoso o in particelle sospese, colloidali o microrganismi e pirogeni. Indipendentemente dall'uso per il quale si intende utilizzarli nel laboratorio alcuni se non tutti gli elementi sopraconsiderati devono essere rimossi.

Con particolare riguardo alla preparazione dei saggi immunologici l'acqua occorre nella ricostituzione o nella diluizione di un reagente così come dei controlli e delle soluzioni di calibrazione. E' quindi fin troppo ovvia la necessità che questa sia libera il più possibile da impurità. A quanto sopra detto aggiungiamo l'importanza di tutta la vetreria inclusa quella monouso sintetica che, laddove necessario, deve essere sciacquata con acqua purificata.

Tipicamente nel caso dei tappi l'acqua può lasciare residui inorganici di sali in un eccesso di 200 ppm (parti per milione) che inevitabilmente lascia depositi residui nei tubi, nelle pipette e in tutto il "labware".

Metodi di purificazione dell'acqua

I due maggiori metodi di purificazione sono la deionizzazione e l'osmosi inversa.

La deionizzazione è una reazione chimica rapida e reversibile che usa uno scambio tra resine cationiche e anioniche che eluiscono le sostanze disciolte dall'acqua purificandola. Questo procedimento può essere utile per rimuovere la materia organica o colloidale. Un filtro è usato per evitare che stesse particelle di resina possano contaminare esse stesse l'acqua. In alcuni casi si usa un filtro a carboni attivi quale metodo alternativo per la rimozione e la filtrazione di residui organici.

L'osmosi inversa usa una membrana semipermeabile che è in grado di liberare l'acqua dalla maggior parte delle impurità. Il principio alla base della tecnica è quello dell'osmosi inversa; una pressione più alta della pressione osmotica viene applicata ad una soluzione ad alta concentrazione. Le molecole d'acqua passano attraverso la membrana semipermeabile dalla soluzione altamente concentrata a quella a bassa concentrazione. L'efficienza della ritenzione di ioni disciolti nell'acqua varia tra il 95 e il 97 % mentre per batteri, virus, pirogeni, e masse molecolari organiche ad alto peso è del 99%. Quando necessario tutte e due le tecniche dovrebbero essere disponibili per essere combinate, ad esempio utilizzando l'osmosi inversa come pretrattamento per la deionizzazione.

Valutazione della purezza dell'acqua

Ci sono diversi metodi di misura in base ai quali valutare la purezza dell'acqua da laboratorio; Ciascuno consente di misurare il livello di ognuno dei diversi contaminanti quali quelli sopraindicati.

Inorganici. Tutti gli ioni inorganici trasportati hanno una carica. Gli effetti delle cariche di ioni sono misurati con la resistività e la conduttività: ad un'alta resistività, o se preferiamo una bassa conduttività, corrisponde una migliore qualità e purezza dell'acqua. Il massimo grado teorico di purezza dell'acqua rispetto alla concentrazione di ioni inorganici è di 18 MOhm/cm a 25°C.

Organici. Svariate sostanze organiche o sintetiche sono presenti nell'acqua. I loro livelli

possono essere misurati con diverse tecniche: carbonio organico totale (TOC), Ossigeno disciolto, domanda di ossigeno biochimico e domanda di ossigeno chimico (Williams, 1984 619.623). In genere il valore tipico di riferimento usato per un alto valore di purezza viene espresso in TOC e vale dai 20-100 parti per miliardo (ppM).

Solidi in sospensione. per identificare particelle solide in sospensione il più indicato dei metodi è senza dubbio la torbidimetria che usa la quantità di luce assorbita per interferenza da una soluzione quale misura della quantità di particelle sospese rispetto a quelle di un campione precedentemente deionizzato.

Gas in sospensione. L'anidride carbonica è un anione molto debole quindi per la sua determinazione non possono essere adottati i criteri di conducibilità elettrica, infatti per misurare i livelli di ossigeno disciolto vengono usati elettrodi dedicati.

Microrganismi Metodo certo e sicuro per la riprova della presenza di microrganismi in un campione di acqua è quello della crescita colturale in brodo o in terreno solido.

Evidentemente la normale quantità di unità formanti colonie per ml (CFU/ml) dovrà essere considerata da microrganismo a microrganismo e in taluni casi laddove sospettiamo un patogeno, da ceppo a ceppo. Dobbiamo precisare che i terreni utilizzati per il pannello di controllo dovranno quindi essere sia a largo spettro che selettivi.

Sostanze colloidali. Queste sostanze si trovano all'interfaccia tra la sospensione e la soluzione. Quando sono presenti nell'acqua ne alterano la torbidità e molti parametri chimico-fisici. In genere il livello di sostanze colloidali viene usato come indice di infestazione biologica e viene riferita alla misura di un condensato accumulato su un filtro o via torbidimetrica.

Pirogeni. Si tratta di sostanze biologiche in grado di elevare la temperatura corporea se iniettate in mammiferi. I pirogeni trovati nell'acqua derivano in genere dalla rottura di pareti batteriche di Gram-negativi o laddove identificate endotossine. La metodologia usata per la valutazione del potere pirogeno di una soluzione è il "rabbit test" (test sul coniglio), mentre per determinare le endotossine si usa specificamente il test del lisato amebocita del *Limulus* (LAL).

Livelli raccomandati di qualità dell'acqua.

L'acqua ideale utilizzata in laboratorio per la calibrazione o la diluizione di reagenti ha una resistività tra i 10-18 Mohm per cm. a 25°C, una TOC tra i 20 e i 100 ppM e un ph = 7. Va comunque ricordato che la maggior parte dei saggi immunologici non richiedono una tale qualità dell'acqua. Infatti possono essere condotti con un'acqua che abbia non meno di 5 Mohm/cm a 25°C con un contenuto organico non inferiore alle 2 parti per milione. Inoltre, a seconda delle applicazioni è in genere sufficiente acqua deionizzata controllata automaticamente dallo stesso impianto di purificazione per la sua conduttività, con questa acqua possiamo sia lavare che diluire i nostri campionamenti.

Controllo di Qualità sui Campioni

Introduzione.

L'informazione clinica è disponibile solo se i campioni dei pazienti sono collezionati e conservati in condizioni ottimali. Ci sono 3 passi salienti per il processo del controllo del campione:

la raccolta del campione,

la centrifugazione,

la conservazione.

Tipicamente i campioni dovrebbero essere centrifugati al loro arrivo nel laboratorio e nel caso

questo non sia possibile immediatamente si deve provvedere alla loro conservazione a 4°C ma non oltre le prime 3-4 ore.

Raccolta dei campioni.

La tempestività utilizzata nella raccolta dei campioni condiziona la stessa interpretazione dei risultati ottenuti con i saggi immunologici. Inoltre per alcuni parametri è indispensabile una raccolta veloce. Bisognerebbe curare la informazione data al personale che raccoglie il campione per quanto concerne la migliore scelta dell'anticoagulante e le condizioni più stringenti da seguire in ragione del test richiesto. È noto come alcuni analiti per essere determinati nel plasma esigano un anticoagulante che non sia l'eparina, la quale può interferire in alcune analisi. Quando l'eparina è usata terapeuticamente i tecnici di laboratorio dovrebbero verificare la presenza di piccoli aggregati di fibrina nel siero. Nei pazienti trattati con eparina il passaggio di fibrinogeno in fibrina accade lentamente, in modo che la formazione di fibrina può completarsi solo dopo la separazione delle cellule del sangue. Questo piccolo e talvolta quasi invisibile aggregato potrebbe passare inosservato specialmente per un pipettatore automatico ma di certo conduce a risultati imprecisi e inaccurati. Proprio per evitare il problema appena esposto si ricorre alla centrifugazione dei campioni prima del saggio.

La centrifugazione.

Nella centrifugazione soprattutto la temperatura deve essere considerata il parametro critico; questo perché alcuni analiti, specialmente ormoni peptidici come il glucagone e l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), possono deperire velocemente. In questi casi la temperatura suggerita e controllata termostaticamente è 4°C.

Conservazione del campione.

Mai congelare campioni di sangue intero prima della separazione degli elementi figurati dal siero/plasma. Quando un campione di sangue viene scongelato, inevitabilmente una emolisi accade con susseguente rilascio di detriti e sostanze indesiderate. Tale emolisi porta quindi a una diluizione del contenuto delle cellule che falsa o quantomeno esagera i livelli di alcuni parametri e di alcuni analiti saggiati. È in altre parole inevitabile che il contenuto delle cellule o dei detriti di membrane disciolte interferisca nei saggi immunologici.

Dopo la centrifugazione è preferibile dispensare i campioni di plasma e di siero in aliquote di 0.5 ml. Frazioni multiple sono utili perché eviteranno ripetuti scongelamenti del campione che deve essere ridiluito o rianalizzato. Peraltro congelamenti e scongelamenti multipli portano a risultati errati per via della degradazione molecolare cui vanno incontro aggregati peptidici, e per quanto si è detto prima questo influenza la concentrazione di contaminanti e le proprietà chimico fisiche della soluzione quali la viscosità.

Quando il test sul campione si è pianificato nella stessa giornata il siero o il plasma dovrebbe comunque essere refrigerato prima del test. Tubi di polistirene, piuttosto che polialomero, dovrebbero essere usati per conservare campioni a -20°C fino ad un mese, laddove per periodi più lunghi e piccole capacità è preferibile usare tubi di polipropilene che hanno una più bassa permeabilità e riducono l'evaporazione durante la conservazione. In alcuni casi, ad esempio alcune molecole adsorbibili dalla plastica come il glucagone, il vetro risulta insostituibile. Dopo essere stati congelati, e quindi scongelati i campioni devono sempre essere gentilmente agitati in modo da redistribuire qualunque gradiente di concentrazione che possa essersi generato durante la conservazione.

Preparazione dei Controlli e dei Reagenti

Il controllo di qualità nel saggio immunologico inizia con un'accurata preparazione dei reagenti e dei sieri di controllo. È importante seguire meticolosamente le istruzioni che si

trovano in genere allegate alla confezione del kit. Una particolare attenzione va prestata per la critica ricostituzione del preparato sia esso congelato o liofilizzato. Le vials dovrebbero essere aperte con attenzione o permettendo all'aria di entrare in modo lento e progressivo adeguando la pressione negativa e per impedire al materiale di fuoriuscire in seguito allo sbalzo d'aria.

La ricostituzione dovrebbe essere condotta con pipette calibrate e un corretto solvente ad una appropriata temperatura. La soluzione mix nel momento in cui è creata deve essere trattata e trasportata con attenzione per evitare la formazione di bollicine. Analoga attenzione va prestata per le gocce occasionalmente adese sotto il tappo a vite potenzialmente portatrici di sostanze contaminanti. Quando la suddivisione dei campioni è richiesta dal tipo di test, ad esempio aliquote di controllo, è meglio usare dei tubi di polipropilene per via della loro bassa permeabilità.

Quando preparazioni di reagenti e controlli devono essere conservate è importante attenersi alle istruzioni dei produttori, tutte riconducibili alle seguenti linee guida generali:

- *reagenti liquidi, congelati o liofilizzati dovrebbero essere conservati tra i 2 e gli 8°C*
- *reagenti trasportati in ghiaccio secco dovrebbero essere conservati a -20°C*
- *dopo la loro ricostituzione reagenti congelati o liofilizzati dovrebbero essere tenuti tra 2 e 8°C per brevi periodi o aliquotati a -20°C per periodi più lunghi.*
- *reagenti scongelati non dovrebbero mai più essere congelati.*

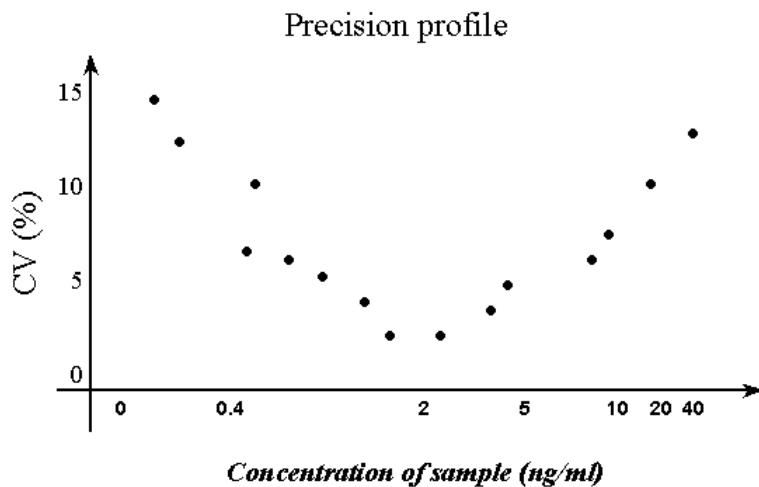
Controllo di Qualità del Saggio di Laboratorio

Campioni di controllo di qualità dovrebbero sempre essere inclusi ad ogni saggio, ad ogni lettura e periodicamente in modo casuale lungo una seduta. I campioni di controllo forniscono una verifica retrospettiva per ogni test che si è lanciato sulla base dei seguenti parametri:

- *la precisione intra-saggio, attraverso la valutazione in duplicato*
- *la precisione inter-saggio, grazie alle variazioni di valori nei campioni di controllo ottenuti su differenti letture e differenti piastre*
- *il bias (rumore di fondo) ottenuto dal confronto dei valori delle medie rispetto ai valori target presupposti*
- *la tendenza, la ciclicità e il raggruppamento (trend, cycles and patterns), monitorati con attenzione grazie a "control charts". Questo approccio può essere anche applicato ad altri parametri come la percentuale di binding a concentrazione 0 (% Bo).*

Tutti i controlli sopracitati implicano un confronto dei risultati ottenuti nelle varie letture con quelli di letture precedenti. La consistenza dei controlli e la curva di calibrazione all'interno di un saggio e tra saggi successivi indicano se o meno i risultati clinici correlano.

Precisione intra-saggio.



La precisione all'interno dello stesso saggio è valutata calcolando i coefficienti di variazione (CV) delle concentrazioni di duplicati di controllo e di campioni dei pazienti.

I CV vengono meglio interpretati se rappresentati in forma grafica contro il valore di una concentrazione ed in questo caso parleremo di "grafico del profilo di precisione" (precision profile chart, vedi figura)

Quando disegnata la curva di precisione deve indicare un criterio di accettabilità pari al CV del 5% per almeno il 90% se non tutti i risultati ottenuti al più basso livello di concentrazione di calibrazione. Il rimanente 10% dei risultati può eventualmente avere un valore di CV moderatamente più alto, ma questo deve accadere per i valori di fine range calibrazione e non nel mezzo.

Quello sopra descritto è il profilo ideale per una analisi nella routine di un laboratorio clinico, ma bisogna comunque puntualizzare che ci sono ancora alcuni analiti per i quali è difficile ottenere un range di calibrazione minore del 5%. Infatti questi analiti hanno insiti alcuni problemi di riproducibilità che superano i limiti della tecnologia; alcuni metodi di determinazione che ricercano determinati analiti in fluidi biologici non potranno per definizione essere precisi in modo assoluto.

Molte, oltre quelle citate, possono essere le cause di una scarsa precisione. Citiamo ad esempio quegli analiti con scarsa immunogenicità e che raramente producono anticorpi ad alta affinità. E' evidente che la grandezza e la forma dello stesso analita ha un effetto sulla capacità legante con l'anticorpo a causa di impedimenti sterici. Analogamente un saggio potrebbe offrire un ridotto periodo di incubazione o un'altra condizione ottimale laboratoristica che vada a spese della precisione.

La precisione inter-saggio

Preparazione di controllo. I controlli per la valutazione tra 2 saggi devono essere usati da 2 differenti fonti: controlli interni inclusi in ogni lettura e controlli esterni analizzati periodicamente come parte del "external quality control scheme". Tre tipi di controllo devono essere usati per il Controllo di Qualità Interno (CQI):

- Preparazioni commerciali di controllo,
- pools di campioni di pazienti e
- controlli forniti dagli stessi kit commerciali.

Preparazioni commerciali di controllo.

I controlli commercialmente disponibili hanno una serie di vantaggi in quanto prescindono dal metodo di determinazione, sono stabili, sono già congelati o liofilizzati e sono disponibili in

grandi quantità tali che un singolo lotto possa essere utilizzato per lunghi periodi e diverse misurazioni. Inoltre molti controlli commerciali consentono la determinazione di diversi analiti ognuno concentrato a livelli ottimali di controllo. I produttori aggiustano anche il contenuto di sali e la concentrazione di proteine in modo da assimilare il comportamento del controllo a quello di un siero non processato. E' molto importante capire che i controlli commerciali sono utili nella routine del CQ ma non dovrebbero esser mai usati per confrontare saggi differenti dello stesso analita. La presenza di alte concentrazioni di differenti analiti nella stessa preparazione commerciale di controllo può portare a differenze sensibili nei valori di controllo tra i metodi che usano differenti antisieri, e questo è spiegabile per un ovvio meccanismo di cross-reattività. Questo può anche portare ad una modifica nei valori di controllo se il produttore cambia il sistema di riconoscimento anticorpale del proprio kit.

Pools.

Preparati di controllo possono anche esser preparati in casa mescolando campioni di vari pazienti. Questo pool di campioni ha il vantaggio di essere economico, di avere più o meno la stessa composizione dei campioni della routine e di poter identificare analiti particolari non disponibili nei controlli commerciali. Comunque il pool ha anche notevoli svantaggi che dovrebbero sempre essere considerati:

- i sieri possono esser positivi per l'epatite B o l'HIV,*
- sono piuttosto instabili se non opportunamente congelati o liofilizzati,*
- sono disponibili in piccole quantità e a concentrazioni non predittibili.*

Pertanto un pool di sieri fatto in casa non dovrebbe essere utilizzato quale criterio di correlazione in quanto il deperimento degli analiti non potrà mai essere escluso. Rimane il pieno utilizzo di carattere qualitativo.

NOTA: La possibilità di mescolare pools di campioni per creare un proprio controllo di riferimento si presta a controverse interpretazioni. Sul piano realistico, non teorico, pochi laboratori possono praticare questa metodica in modo sistematico. Il limite pratico maggiore alla tecnica deriva dalla impossibilità di standardizzare in modo completo il comportamento (stabilità e titolazione su grandi volumi) senza dover creare un protocollo di qualità ad hoc per il Controllo considerato. Questo dispendio di energie e risorse non è evidentemente giustificato in un laboratorio di routine e di fatto rimane più conveniente il Controllo commerciale anche dal punto di vista economico.

In ultima analisi bisognerebbe fare anche una considerazione sull'apparente contraddizione di termini: Controllo interno e Controllo fatto in casa con i pools. Ossia non è teoricamente possibile verificare la bontà del proprio controllo in modo autonomo in quanto un Controllo di riferimento per definizione diventa tale dopo un trial di Controllo esterno multicentrico (vedi di seguito) supervisionato e validato da laboratori terzi.

Kit commerciali del produttore.

Il terzo tipo di controllo interno viene fornito con lo stesso kit e frequentemente viene preparato nello stesso modo di calibrazione e quindi potrebbe non comportarsi allo stesso modo dei campioni. Questo tipo di controllo dovrebbe unicamente essere un'attendibile misura della variazione interlotto dello stesso kit commerciale lungo ampi periodi. Ricordiamo che spesso neppure questo è possibile per via della continua modifica di numerazioni della stessa fornitura.

Nota: Appare evidente del perchè indispensabile sia l'adozione di un controllo esterno per un CQ interno significativo sulla base del quale validare o rigettare le misurazioni dei campioni dei pazienti.

Programma interno di CQ.

QUALITY CONTROL

CONTROL PREPARATION: UVW PARAMETER: Human Growth Hormone
 EXP. DATE: Oct 91 KIT: XYZ
 MASTERLOT: 2785V UNIT: mU/l

			LOW		MEDIUM		HIGH		LOT No.	EXP. DATE
N	SD	%CV	20	0.12 3.7	20	0.54 3.7	20	2.2 5.1		
MEAN \bar{x}				3.26		14.6		42.5		
$\bar{x} \pm 2SD$				3.02 – 3.50		13.5 – 15.7		38.2 – 46.8		
DATE	TECHN.									
10 Apr 90	CC		3.33		14.7		45.4		32051	9 May 90
17 Apr 90	KC		3.40		14.2		45.3		"	"
24 Apr 90	CC		3.40		14.6		46.7		"	"
30 Apr 90	MK		3.30		15.3		48.3		"	"
8 May 90	AL		3.43		14.8		45.1		"	"
14 May 90	SvA		3.48		14.6		45.5		32463	30 May 90
22 May 90	SvA		3.33		14.9		46.2		"	"
29 May 90	AL		3.46		14.3		44.1		"	"
5 Jun 90	RS		3.11		14.9		44.2		33064	25 Jul 90
12 Jun 90	GV		3.47		15.4		46.7		"	"
19 Jun 90	MV		3.44		15.0		41.7		"	"
26 Jun 90	LT		3.49		15.4		42.7		"	"
3 Jul 90	LT		3.33		14.2		38.9		"	"
10 Jul 90	LH		3.42		14.6		42.4		"	"
17 Jul 90	GV		3.36		15.5		45.0		33560	06 Sep 90

Un programma interno di CQ deve essere costituito principalmente di due elementi:

1. un metodo di registrazione dei parametri chiave, quali valori di controllo, per ognuno dei saggi. Tale metodo dovrebbe includere anche una rappresentazione grafica dei valori;
2. un sistema di regole sulla base del quale decidere l'accettabilità o il rigetto dei risultati; questo sistema dovrebbe anche cadenzare un calendario nel quale si possa studiare le modifiche di performance.

Sebbene in linea teorica i grafici possano essere disegnati a mano in sempre più numerosi laboratori si adottano sistemi computerizzati che oltre a snellire la routine e velocizzare l'interpretazione, riducono gli errori e avvisano automaticamente della presenza di non conformità.

Fogli di lavoro per i controlli

Può sembrare fin troppo elementare condurre il metodo di valutazione di cui al primo punto, eppure non è possibile prescindere dall'uso di opportuni fogli di lavoro o tabelle di controllo per riassumere acquisire i valori necessari all'interpretazione del proprio operato. Riferiamoci ad esempio alla tabella riportata in monografia (solo versione HTML e Word), che riproduce una tabella di controllo basata su tre diverse concentrazioni saggiate ognuna con una diversa lettura il cui scopo è quello di monitorare le variazioni inter-saggio e inter-lotto. Il valori di controllo sono ottenuti e registrati sul foglio di lavoro e ogni 20 letture si calcola la media, la deviazione standard e il CV. Grazie alla tabella è possibile nel tempo individuare le variazioni tra i saggi così come tra i lotti. E' auspicabile che tra una misurazione e l'altra si svolgano più letture possibile in modo da rendere più significativa e attendibile la media e la deviazione standard.

Pensiamo a come utile siano le speculazioni sulle variazioni inter-lotto fatte in proprio. Non

tutti i produttori praticano correttamente il Controllo di Qualità, e soprattutto questi dati periodici rappresentano il primo passo significativo per l'analisi di audit statistico del processo (SPC), così come indicato dalla normativa sulla qualità. La finalità è quella di rappresentare e rivalutare i trends (le curve di tendenza), dei valori di variazione in un lasso di tempo sufficientemente ampio da poter individuare valori critici di non conformità; quindi sulla base della raccolta sistematica e proceduralizzata di queste tecniche di CQ, poter risalire alla lettura, all'analista, all'operatore e al lotto affetti da non conformità potendo quindi stabilire misure correttive o di adeguamento per il futuro (vedi. ISO14000, HACCP).

Shewart/levey-Jennings control chart

I valori tabellati, soprattutto se giornalmente calcolati, sono di difficile lettura e interpretazione. Un comodo sistema di studio consiste nella rappresentazione del grafico di **Shehart/Levey-Jennings**, anche noto agli esperti di SPC (Statistical Process Chart) come UCL/LCL (Upper/Lower Control Levels). Riferiamoci alla figura accanto che indica un tipico esempio dove in ascissa sono rappresentati i tempi e in ordinata i valori di deviazione standard appare evidente la leggibilità chiara dell'andamento della variazione tra due valori soglia che rappresentano i limiti al di sopra e al di sotto dei quali uno più valori di variazione non sono conformi.

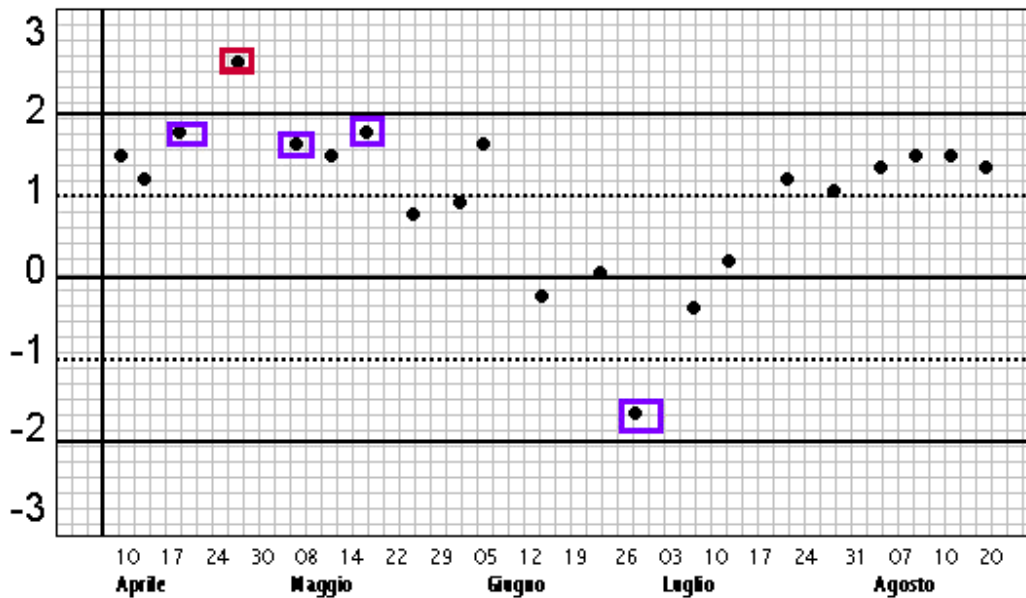


In questo grafico i valori di soglia individuano un canale di accettabilità entro il quale tutti (o la maggioranza di valori stimati), deve trovarsi per avere una significatività ottimale. In genere sull'asse delle ordinate vengono indicate le linee corrispondenti a 2 volte e 3 volte il valore di deviazione standard sul campionamento considerato.

Va immediatamente puntualizzato che è indispensabile identificare l'andamento di un grafico con il periodo, il reagente, l'analista ed il lotto cui ci si riferisce. Nel caso poi si stia valutando un solo kit, allora sull'asse delle ascisse si potrà indicare la sola data di lettura giornaliera. Come si è detto in genere i limiti di confidenza all'interno dei quali si indicano i valori accettabili sono 1, 2 fino a 3 volte il valore della deviazione standard (scostamento quadratico medio). In particolare i valori compresi tra 2 e 3 volte la deviazione standard devono coprire il almeno il 95% del limite di confidenza, ossia almeno il 95% dei valori campionati, devono cadere entro questa soglia. Per definizione, circa il 99,7% dei valori dovrebbe comunque sottostare entro il limite di 3 volte il valore di deviazione standard implicando questo che su 10 punti un valore si trovasse al di là di questo limite, la lettura dovrebbe essere rigettata e il campionamento ripetuto. A questo poco realistico modo di agire si ovvia considerando statisticamente almeno 20 punti.

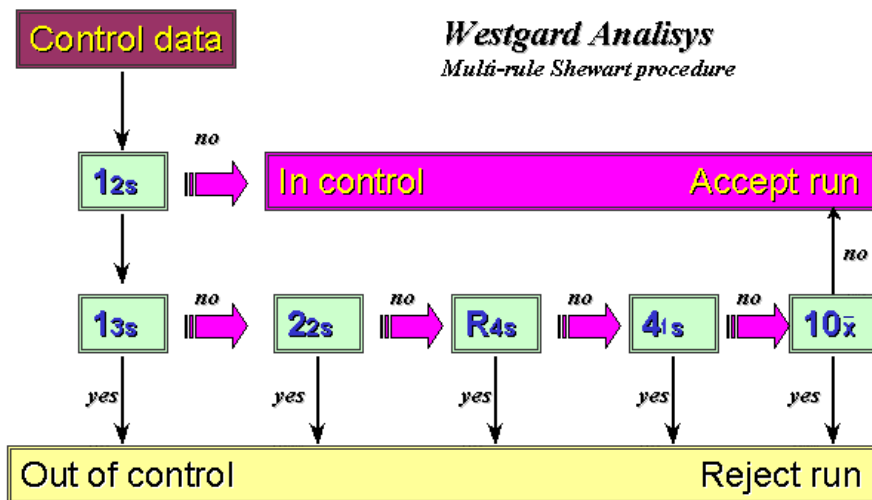
Il grafico di controllo richiede la stima di valori di media e di deviazione standard relativi ad ogni controllo usato. Il minimo valore di campioni per una significatività adeguata è di 10, ma con 20 o più si darà una stima ancora migliore (In particolare con 10-20 campionamenti il valore della media geometrica va rettificata quale media campionaria; vedi rif. Shaum in bibliografia).

Shewhart/Levey-Jennings Chart (UCL/LCL)



Comunque, una volta calcolate media e deviazione standard relativi ad un controllo, queste possono essere teoricamente applicate a tutti i lotti successivi dello stesso analita, sebbene comunque sia conveniente rivalutare almeno in percentuale il CV calcolato su una nuova lettura in percentuale rispetto a quella adottata come riferimento iniziale. Evidentemente in questa ipotesi supponiamo di confidare sui valori target di riferimento che molti produttori indicano nelle loro confezioni commerciali. Addirittura, e sempre più spesso, i produttori includono anche gli estremi del metodo di valutazione usato per quel kit e quel lotto, permettendo una verifica più accurata del valore di CV. In genere ragionando in termini di CV percentuale un valore di variabilità del CV non superiore al 10-12% significa una dignitosa accettabilità, oltre avremmo il rigetto.

Nota: in ViroCQ 2.1 automaticamente campionamenti minori di 10 valori vengono rifiutati, e comunque tra i 10 e i 20 valori, il peso delle eventuali non conformità viene distribuito rettificando il valore della media (media geometrica e pesata),



Torniamo alla importanza di avere un grafico di controllo, soprattutto se espresso come grafico a dispersione (vedi figura allegata); questo risulta prezioso nella individuazione di fenomeni di bias o scarsa precisione (vedi "Precisione e Accuratezza" sopra), infatti un eccesso di campioni sopra i valori di 2 deviazioni standard, richiedono l'intervento di una persona con maturata esperienza prima di una seconda lettura, e se comunque due controlli nello stesso saggio superano le due deviazioni standard, allora l'intero saggio deve essere invalidato.

Westgard Analysis

Una volta adottati, molti sono gli usi adattabili ai grafici di controllo di Shewhart/Levey-Jennings e svariate le speculazioni e le interpretazioni a seconda dei parametri che si sono utilizzati e dei criteri di raggruppamento delle letture (es.: uguali kit per lotti diversi, stessi lotti periodi diversi o stessi analiti, lotti diversi e stesso operatore).

La collezione di regole decisionali applicabili ai grafici di controllo vengono collettivamente chiamate **Multi-rules Shewart Analysis** o anche **Westgard Analysis**. Con la Westgard analysis in particolare è possibile mettere a fuoco un flusso di controllo euristico, basato cioè su regole, in base alla quale automatizzare il processo decisionale di accettabilità o negazione dei risultati. Talvolta con questa procedura si possono includere anche precedenti letture, e siccome per questa metodologia bisogna tener conto di regole differenti, da qui il termine "Multi-rule".

La bellezza della Westgard Rules consiste, nella capacità di fornire una bassa probabilità che saggi normali vorrebbero rigettata, e al contempo, aumentare la probabilità di individuazione di errori che saggi normali tendono ad occultare. Le difficoltà nella valutazione di questi parametri risiede nella implicita variazione statistica di fondo (Bias) del sistema.

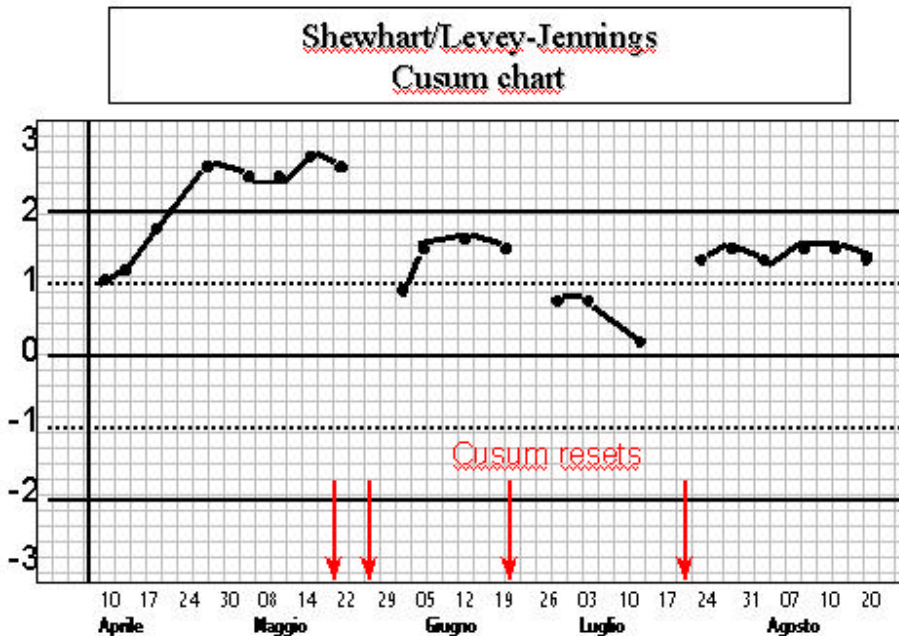
Almeno due regole decisionali dovrebbero essere adottate per una onesta valutazione del CQ, una che tenga in considerazione l'errore analitico casuale, ed una seconda che identifichi l'errore analitico sistematico. In altre parole dovremo poter almeno discriminare tra le componenti strumentali e di labware, rispetto al peso della manipolazione umana.

A questo scopo Westgard ha descritto sei differenti criteri decisionali applicabili a due o più preparazioni con differenti concentrazioni saggate nella stessa lettura. La decisione di accettabilità senza alcune successive ripetizione del test è vincolata alla conformità e alla verifica di tutte le regole.

Per brevità e convenienza spieghiamo e commentiamo questo modello con il paragrafo successivo ricorrendo a simbolismi e iconografie, laddove per una completa trattazione

dell'argomento si rimanda alla letteratura indicata a fine monografia.

CuSum Chart



Molto apprezzati come variazione dell'uso delle curve Levey-Jennings, sono i **Cusum chart**. Infatti per quanto significative, le valutazioni con i grafici di Levey-Jennings sono soprattutto utilizzate nel lungo periodo, mentre sono scarsamente sensibili alle piccole variazioni di medie all'interno di piccoli periodi di tempo. Ecco quindi che per evidenziare piccole escursioni di valori, dietro quali si celano spesso cambio di kit o di lotti, si preferisce ricorrere alle Cusum charts. Questi grafici molto intuitivi sono anche chiamati grafici delle Somme Cumulative e sono simili ai grafici di controllo UCL/LCL di cui si è detto, con una fondamentale differenza: invece di mostrare i valori di ogni controllo, si calcola il valore della differenza (delta values) tra il valore medio considerato e il valore target (atteso) fornito dal produttore, e questo valore si somma cumulativamente con tutti i valori di differenza precedenti.

Nel grafico Cusum (vedi figura; solo versioni Word e HTML), l'asse delle ascisse orizzontale significa Bias zero (rumore=0), per cui qualunque valore di bias risulta in un punto distante dalla linea centrale dello zero ed è positivo sopra e negativo sotto il valore dello zero. Il segno delle variazioni di delta consecutivi è proprio la chiave vincente per individuare significativi cambi di direzione nell'errore medio rispetto alla accuratezza con il quale la media di un campionamento si è allontanato dal rispettivo valore atteso.

La maggior parte dei grafici Cusum iniziano comunque da un valore di riferimento per la deviazione considerando quindi solo quei punti in cui si è smaccatamente superato il valore di delta consentito; tale valore è tipicamente assunto intorno allo 0.5 o una deviazione standard (1SD). Se la differenza tra il valore cambia segno allora la linea tracciante continua si interrompe a indicare un cosiddetto punto di "rottura" (Cusum resets), riprendendo dalla serie successiva la continuità fino al successivo cambio di segno significativo, e così via. Un utile schema di foglio di lavoro per la raccolta dati del Cusum chart è sotto riportato.

Date	Control concentration (mU/L)	Bias (value - \bar{x})	Bias - $0.5s$	Cusum	
10 April	45.6	0.6	"	0.0	
17 April	45.2	0.2	"	0.0	
24 April	46.8	1.8	0.9	0.9	
30 April	48.4	3.4	2.5	3.4	
8 May	45.6	0.6	"	3.4	
14 May	45.4	0.4	"	3.4	
22 May	46.6	1.6	0.7	4.1	
29 May	45.0	0	"	4.1	
5 June	44.8	-0.2	"	0.0	Reset
12 June	46.6	1.6	0.7	0.7	Reset
19 June	45.4	0.4	"	0.7	
26 June	45.0	0	"	0.7	
3 July	43.4	-1.6	-0.7	-0.7	Reset
10 July	44.8	-0.2	"	-0.7	
17 July	46.8	1.8	0.9	0.9	Reset
24 July	45.8	0.8	"	0.9	
31 July	45.5	0.5	"	0.9	
7 Aug	46.2	1.2	0.3	1.2	
14 Aug	45.7	0.7	"	1.2	
21 Aug	45.9	0.9	0.0	1.2	

Control mean (\bar{x}) = 45.0
Standard deviation (s) = 1.8
%CV = 4.0
Threshold ($0.5s$) = 0.9

Una proprietà certamente notevole del Cusum chart è la capacità di allertare visivamente su quelli che potenzialmente sono i cosiddetti Critical Control Points (CCP) su cui non solo il CQ interno di laboratorio ma molti altre attività di misura e reauditing sono utilizzati nelle industrie, soprattutto agro-alimentari, per i loro saggi interni di controllo qualità secondo le direttive HACCP intese a trovare i potenziali punti di contaminazione. Insomma si tratta di un potente metodo di individuazione dei problemi lungo un qualunque processo.

Parametri per il CQ oltre i controlli

Sebbene i controlli rappresentino un certo e sicuro punto di riferimento nella stima del proprio CQ interno, molti altri parametri possono essere utilizzati e per questi valgono le metodologie e le considerazioni fatti in precedenza per i controlli. Riassumiamo qui di seguito alcuni casi:

- percentuale di binding a concentrazione zero.
- percentuale di binding alla massima concentrazione del calibratore
- Binding non specifico (NSB)
- Curve-fitting parameters quali migliore intercetta, pendenza della curva di trend, analisi della varianza
- Dose stimabile (Estimated Dose, ED) al 20%, 50% e 80% di binding. Dove con ED50 si indica la concentrazione corrispondente al il 50% del binding massimo.

Ognuna di queste variabili può fornire indicazioni addizionali sulla qualità del test, sul comportamento dei reagenti e sulla bontà della reazione avvenuta in determinate condizioni sperimentali. Ad esempio, è piuttosto acquisito che un NSB (binding non specifico) può indicare che il controllo sta degradando, o che una bassa percentuale di binding potrebbe essere spiegata come una incubazione a temperatura troppo bassa.

Schema di CQ esterno

Un controllo di qualità condotto secondo uno schema esterno al laboratorio (**External QualityControl Scheme, EQCS**) rappresenta un modo di verificare i propri valori con un indipendente criterio di valutazione. Nel Regno Unito queste procedure sono indicate come **external quality assessment scheme EQAS**, mentre negli Stati Uniti queste metodologie sono indicate come **Proficiency Testing Schemes**.

Ad intervalli regolari una serie di campioni di controllo sono contestualmente inviati a più

laboratori. Nessun valore target (atteso in doppio "blind") viene fornito e i campioni vengono inclusi nelle determinazioni allo stesso modo dei sieri di pazienti. I risultati sono inviati indietro per una estesa valutazione e, ovviamente, consentono un confronto obiettivo tra i vari laboratori che si sottopongono a questo audit. Tipicamente gli schemi esterni durano da 3 a 6 mesi con cadenza periodica di 2 settimane. E' importante puntualizzare come lo spirito di chi organizza questi EQCS sia mosso dalla sola intenzione di scambiare utili indicazioni tra i vari laboratori di riferimento in modo costruttivo, e d'altra parte lo stesso porsi in discussione rappresenta per i produttori un enorme investimento in immagine e credibilità. Infine, gli stessi produttori hanno fatto enormi benefici e miglioramento dalla competizione indiretta implicita in un audit scheme.

A quanto sopra detto va aggiunta una considerazione finale che riguarda gli utilizzatori finali dei saggi che sempre maggiormente contano in un prodotto affidabile e controllato alla fonte. Un EQCS viene in genere ampiamente pubblicizzato redistribuendo i risultati relativi a svariati analiti includendo delle valutazioni di merito e dei punteggi di riferimento tra le prestazioni dei vari laboratori; è facile comprendere come questo meccanismo sia utile per i partecipanti, che siano positivi o cattivi i risultati danno comunque indicazioni preziose e oggettive ma, soprattutto, consentendo di identificare un problema come imputabile alla componente strumentale piuttosto che umana e viceversa.

Adirittura bisogna riflettere che questi dati essendo pubblicamente accessibili possono venire incontro anche a terzi laboratori che hanno problemi di controllo di qualità e non hanno direttamente partecipato all'EQCS, ma traggono così beneficio dall'esperienza altrui.

Grazie a questi programmi esterni di controllo di qualità si possono discriminare problemi sistematici (consistenza tra tutti i campioni in laboratori differenti), problemi su alcuni campioni specifici (matrix problems), problemi a concentrazioni specifiche per un analita (dose-dependent bias) o con un set di dati da un particolare set di controlli (problemi inerenti la ricostituzione o la determinazione).

Concludendo, un meticoloso programma di EQCS può fornire linee guida generali e unificanti, un mezzo di riferimento assolutamente obiettivo di informazioni, suggerimenti e formazione su vari aspetti dei saggi considerati e la valutazione indipendentemente della efficacia e della bontà dell'attività di un laboratorio rispetto al CQ interno.

Nota conclusiva

Mi sembra indispensabile concludere con qualche riga di commento che, forse, avrebbe potuto essere una introduzione o una prolusione iniziale. Eppure per due buone ragioni riconducibili proprio alla Qualità, negli ultimi anni ho perduto il vezzo accademico di discutere sulle cose e anticiparne le conclusioni prima di averle trattate in modo adeguato. La prima ragione è legata alla scoperta di una dilagante cattiva abitudine dei miei colleghi a leggere solo e distrattamente il Summary di un lavoro; voi che se siete arrivati fin qui e state scorrendo con la vostra lettura queste parole, evidentemente non appartenete a questa phylum. Una seconda ragione è legata al fatto che lo spirito stesso della conclusione di un argomento deve portare a delle considerazioni di applicabilità sul campo, e gli aspetti metodologici... Eppure questi non prescindono da uno studio strategico e metodologico della "condotta umana" sul lavoro. E' quantomeno incoerente trattare questi aspetti all'inizio di una monografia anche perchè, in questo caso, si tratta più di linee guida e manualistica operativa. Quanto sopra premesso mi preme sottolineare come la apparente ovvietà di alcune metodiche (perfino risibile), abbia altalenato con la inverosimilità di altre durante tutto lo studio delle normative internazionali sul CQ. Questa sensazione di disagio credo colpisca chiunque abbia anni di esperienza sul bancone della sierologia, questo perlomeno è ciò che è accaduto

a me.

Una spiegazione di questo fenomeno credo risieda nella presunta non praticabilità di metodologie pragmatiche nella situazione realistica italiana. E' in effetti molto stringente il controllo del proprio operato, proprio perchè di controllo si tratta. Ma in proposito vorrei invitare i colleghi che si sforzano di capire, ad approcciare il mondo della qualità più come ad una filosofia che ad una ortodossia religiosa.

Non è intenzione dare uno stile saggistico alle mie righe, quindi vorrei soprattutto precisare che anch'io sono italiano, e so' di esserlo, cionondimeno per il CQ ho la ferma convinzione che la motivazione, la persuasione, la lealtà intellettuale verso la conoscenza sono dei requisiti indispensabili. Nessuno possiede queste consapevolezza negli esoni alla nascita, ma chiunque li può acquisire se adeguatamente educato. Vorrei consigliare ai colleghi di concentrare i loro sforzi soprattutto sulla formazione ed il miglioramento.

La qualità ha un costo di monetizzazione ed un pesante onere di studio, ma a conti fatti, la non qualità costa molto di più e non solo a noi stessi.

Salvo Reina Eurobiol
mailto:reina@village.it

</DIV>

Letteratura

1. Maisonneuve, S.A. In: "European Pharmacopeia, Bacterial Endotoxin.(Sainte-Ruffine, France, 1987).
2. U.S. European Pharmacopeia, Bacterial Endotoxin test. (Mack Publishing, Easton, PA, 1985)
3. Westgard, JO, Barry, PL, & Hunt MR, Multi-rule Shewart Chart for Quality Control in Clinical Chemistry. Clin.Chem. 27,493-501 (1981).
4. Williams,S. Official Methods of Analysis. (Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1984).
5. Wild D. Clinical Laboratory Improvement amendments of 1988, CLIA 1988, The Immunoassay Handbook: Laboratory Managements.
6. Sunderman, F.W. The history of proficiency of Testing/Quality control. Clin.Chem 1992;38; 1205.
7. Cembrowski,GS. and Carey.R.N. Laboratory quality management. Chicago: ASCP Press, 1989.
8. Westgard. J.O. and Klee, G.G. Quality assurance in N.W. Tiatz. ed. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia :Saunders, 1886; 424-58.
9. National Committaa for Clinical Laboratory Standanto. Int"ma) quality control: Principla3an(ladafinjtions:Approv"dGuicatatlna,NCCLSdocum6ntC24.A. Villanova: NCCLS, 1&91.
10. Wtestgard,J.O.,Groth,T.anddftV6rd)er,C.H. PrinapftftstordevelofNngtmpnmd quality controftirocedures. Scand.J.Clin.Lab.Invmt. 1984; 44: suppli. 172.
11. Weatgard. J.O., Bumett, R.W. and Bowore. G.N. Quality management scierwe in clinjcalchernl"try:adynamjcfraworkforcontinuou")mpn)venMntolquality. Clin. Chem. iMO: 36:1712.
12. N8th.N..MlkinBon.S.,Dodd.R.Y. UwofacantroisenJmcontainingalowlewlof HBsAg for monitoring proficiency in scfwning tor HBaAg. Transifuston 1966; 26: 519.
13. Epstein.J-S. SensitivilyandconsjstencyolscrMningtastsforantjtxxllestohurnan ifTimJnodeficiencyvirustypel. Transhision1991;3l:3B8.
14. Linijen..t.V.,WB?ers.>).DrBSS)aT.K.P.Controvw"yifltran"fu"ionnMd>dne:UMof extenial controls in transmisufale dneasa testing: Pro. Transfusion 1894: 24:550.
15. Spire. B., Dormont, D., Barra^inoussi, F., Monlagnwr, L. and Chermann, J.C. inacbvation of lymphadanopamy • associated virus by h"at, gamma rays. and littravfolet light. Lancet 1985: i: 188.
16. Mauler. R.. Markle, W. and Hiffenhaus, J. Inactivation of HTLV-III/LAV. hepatitis B and non-A/non-B viruses by PasMurization in human plasma protein preparations. Dev. Biol Stand, 1957: 67:337.
17. U.S.Dapartmw1torHea)thandHumanSafvic"s. BtosafetyinmicTobtologicaland biomedicat laboratorim. HHS Publication (NIH) 934395. Washington: U.S. GovammantPrinting Offloe. May, 1963.
18. National Committe for Clinical Laboratory Standards. Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by Hood, body ltuida, and tissue -Second Edition. Tentative Guideline. NCCLS Document M29-T2. Vilfanova, PA: NCCLS, 1991.
19. National Committeee tor Ctinical Laboratory Standards. Clinical laboratory waste Management; Approved Guideline. NCCLS Document GP5. Villanova.PA: NCCLS, 1993.
20. BlackhawkBioSystems. Inc.,SanRamon.CA S4583 Copyright1995, Blackhawk Biosystems L-0200E 08/95

21. Murray R. Spiegel. Teoria e Applicazione della Statistica. Ed. ETAS Libri Scientifici. 1987
22. ISO standards Handbook. Statistical methods for Quality Control. VOL1, VOL2. Ed. International Organization for Standards. 1996

Tutte le figure originali sono state tratte da: Laboratory Quality Assurance by Pierre Blockx and Manuela Martin, Ed.