

IL CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO NEL SERVIZIO DI MEDICINA DI LABORATORIO

1. PREMESSE	Pag. 3
2. PROGRAMMA “MINIMO” DI BIOCHIMICA CLINICA	Pag. 11
3. PROGRAMMA “MINIMO” DI EMATOLOGIA E COAGULAZIONE	Pag. 23
4. PROGRAMMA “MINIMO” DI IMMUNOEMATOLOGIA	Pag. 37
5. PROGRAMMA “MINIMO” DI MICROBIOLOGIA	Pag. 43
6. PROGRAMMA “MINIMO” DI ANATOMIA PATOLOGICA	Pag. 81
7. ALLEGATI	Pag. 87

Il Controllo di Qualità Interno

PAGINA BIANCA

1.

PREMESSE

1.1. Filosofia: il concetto di programma “minimo”	Pag. 5
1.2. Descrizione del programma	Pag. 7
1.2.1. Generalità	Pag. 7
1.2.2. Elementi descrittivi del programma	Pag. 7
1.3. Attivazione del programma	Pag. 8
1.4. Archiviazione dei dati	Pag. 9

PAGINA BIANCA

1.1. FILOSOFIA: IL CONCETTO DI PROGRAMMA “MINIMO”

Norme legislative sia nazionali, sia regionali prevedono come obbligatoria l'attivazione di sistemi di "Controllo di Qualità Interno" (CQI), secondo linee guida dettate a livello, rispettivamente, nazionale e regionale. L'attivazione di programmi di CQI è prevista da qualsiasi norma di “Buona Pratica di Laboratorio” ed è anche un requisito per l'accesso agli interventi di Accreditamento e di Certificazione.

Il presente documento riporta le linee guida per l'attivazione di **programmi (o sistemi) “minimi”** di CQI per i vari settori del laboratorio clinico, obbligatori per tutti i laboratori. Il termine “minimo” sta qui ad indicare che il singolo laboratorio ha l'autonomia professionale di adottare, in alternativa, sistemi più potenti o più estesi, in armonia per esempio con i suggerimenti di organizzazioni scientifiche nazionali ed internazionali. L'adozione del programma “minimo” è tuttavia da considerarsi sufficiente ai fini di soddisfare i requisiti normativi.

In linea di massima, per tutte le analisi i cui risultati sono riportati in forma numerica rappresentativa di una variabile continua (cosiddette “misure quantitative”), indifferentemente dal settore cui appartengono per competenza (chimica clinica ma anche ematologia e microbiologia per alcune tipologie analitiche), il **programma minimo** è un sistema di controllo statistico di prodotto che risponde alla seguente filosofia.

Ai fini del CQI, è necessario presumere che i processi (analitici, ma anche le relative fasi pre e post-analitiche) adottati e posti sotto controllo soddisfino in partenza i requisiti medici di qualità previsti per la specifica situazione in cui sono utilizzati i risultati. Tale situazione deve essere verificata preliminarmente a cura del responsabile del laboratorio con procedimenti che non vengono qui descritti, perché non facenti parte del sistema di CQI propriamente detto. Parimenti si presume che in partenza, o nel corso del tempo, eventualmente per esempio in occasione delle operazioni di manutenzione ordinaria o straordinaria, si provveda alla verifica delle singole caratteristiche delle varie strumentazioni coinvolte nel processo analitico. Tali verifiche e la loro frequenza dovrebbero essere dettagliatamente descritte nei manuali operativi delle differenti stazioni di lavoro, indipendentemente dal programma di CQI adottato.

Con queste premesse, le caratteristiche e gli scopi di un efficace programma statistico di CQI possono essere così sinteticamente definiti:

- a) il programma ha lo scopo di verificare se nel corso di una serie analitica (o di un giorno di lavoro) le caratteristiche iniziali del sistema analitico (nel suo complesso) hanno subito variazioni talmente importanti da essere segnalate dal sistema di controllo con una probabilità statistica accettabile, generando situazioni di “fuori controllo”;
- b) la segnalazione di “fuori controllo” è resa disponibile in un tempo sufficientemente breve per permettere di attivare azioni atte a riportare la situazione sotto controllo prima dell'emissione dei referti relativi ai campioni analizzati nel corso della serie;

c) con il tempo ed attraverso i meccanismi di valutazione retrospettiva, si accumulano i dati utili alla conoscenza delle caratteristiche di precisione e (con alcuni limiti) di accuratezza dei procedimenti analitici e del loro mantenimento nel tempo.

In linea di massima, quando i risultati dell'analisi non sono disponibili (o non sono riportati) in forma numerica rappresentativa di una variabile continua (cosiddette "misure qualitative" o, con termine metrologicamente più corretto, "osservazioni"), indifferentemente dal settore del laboratorio cui le analisi appartengono, non è possibile o non è agevole attivare programmi statistici di CQI che rappresentino programmi statistici di prodotto, aventi le caratteristiche e gli scopi su brevemente menzionati. È possibile in questi casi attivare sistemi di CQI basati su principi ed interventi di controllo di processo. In sostanza, non si controlla, mediante un campionamento statistico, la rispondenza del prodotto a requisiti predefiniti, ma si sorvegliano le condizioni del processo in cui il risultato analitico viene prodotto, controllandone la rispondenza a requisiti prefissati e scelti in maniera tale da permettere di ottenere un prodotto (risultato analitico) di qualità adeguata.

Si osservi che anche in questo caso, in un certo senso, si sorveglia più il mantenimento delle condizioni prefissate che non i valori assoluti di tolleranza per tali condizioni. A titolo di esempio, le "condizioni" analitiche più facilmente o più frequentemente controllate in una verifica di processo possono essere rappresentate dalla temperatura (incubatori), dai volumi (dispensatori), dalla qualità e/o stabilità (reagenti), dalla specificità (anticorpi), eccetera.

Quando tecnicamente possibile, è tuttavia necessario utilizzare anche in questi casi materiali di controllo, per esempio il "controllo positivo" e il "controllo negativo", al fine della validazione della serie analitica. Come provvedimento estremo si può ricorrere all'analisi in duplicato. È in definitiva responsabilità professionale dell'analista cercare di ottenere informazioni sull'attendibilità analitica dei risultati, adottando i provvedimenti di volta in volta tecnicamente validi ove non è possibile attuare un programma di CQI strutturato come qui descritto.

Il concetto di programma "minimo" su delineato si applica ai sistemi di CQI basati sia sul controllo statistico di prodotto, sia sul controllo di processo. In ogni caso, il programma "minimo" di CQI adottato si deve obbligatoriamente articolare attraverso la messa in opera dei provvedimenti di:

- descrizione;
- attivazione;
- archiviazione;

come di seguito descritti.

1.2. DESCRIZIONE DEL PROGRAMMA

1.2.1. GENERALITÀ

Di ciascun programma adottato deve esistere una descrizione dettagliata, scritta, articolata sulla base degli elementi descrittivi sotto riportati. Tale descrizione deve essere sempre ed immediatamente consultabile da tutti gli addetti e da persone esterne in occasione di eventuali visite ispettive. Nel caso di modificazione del programma la relativa descrizione deve essere opportunamente aggiornata e deve essere registrata la data del cambiamento. Nell'ambito di un laboratorio o di una sua sezione o sottosezione possono ovviamente coesistere più programmi di CQI: di ciascun programma deve esistere la rispettiva descrizione. Si deve rammentare che in particolare i requisiti di Accreditamento e di Certificazione richiedono una descrizione accurata di ogni procedimento attivo all'interno della struttura, inclusi quindi, ovviamente, i programmi di CQI. La descrizione del programma di CQI deve essere aggiornata e/o revisionata quando ritenuto opportuno e comunque ogni volta che si introducano variazioni al programma effettivamente in atto. La descrizione medesima deve essere in ogni momento accessibile agli operatori ed agli eventuali ispettori qualificati.

1.2.2. ELEMENTI DESCRITTIVI DEL PROGRAMMA

- a) Filosofia. Sinteticamente, cosa ci si aspetta dal programma ed a quali interventi può dare luogo.
- b) Ambito temporale di validità. Dal momento dell'attivazione, sino a quando qualche caratteristica subisce una variazione significativa.
- c) Nel caso di controllo di prodotto, materiali. Possono essere descritti in maniera sufficientemente completa menzionando le loro seguenti caratteristiche:
 - matrice ed eventuali aggiunte;
 - stato fisico, incluso eventuali regole per ricostituzione, scongelamento, aliquotazione, conservazione;
 - provenienza (ditta/preparato in laboratorio);
 - se preparato in laboratorio, descrizione dettagliata delle modalità di preparazione, conservazione e di verifica/caratterizzazione;
 - modalità per l'assegnazione dei valori;
 - numero dei livelli di concentrazione;
 - ambito temporale di stabilità nelle differenti forme di conservazione.
- d) Nel caso di controllo di processo, caratteristiche da controllare:
 - elencare gli strumenti, o i loro singoli componenti, da sottoporre a controllo;
 - elencare i singoli reagenti, o le singole materie prime, da sottoporre a controllo;
 - elencare le caratteristiche di ciascuno strumento (o suo componente) e di ciascun reattivo da controllare;

- elencare le modalità per effettuare i controlli, gli eventuali strumenti di controllo e le loro modalità di calibrazione/taratura;
 - per ciascuna caratteristica da controllare elencare il valore atteso e le relative tolleranze, se appropriato.
- e) Procedimento di controllo:
- per ciascun programma elenco degli analiti e/o delle caratteristiche sottoposti/e a controllo;
 - frequenza dell'analisi e/o delle verifiche di controllo;
 - posizionamento dei campioni di controllo.
- f) Valutazione immediata dei risultati:
- tempi previsti per la disponibilità dei risultati ed entro i quali i medesimi risultati devono essere valutati;
 - se pertinenti, regole (statistiche) e limiti di accettabilità adottati;
 - forma tabulare e/o grafica adottata per la registrazione dei risultati delle analisi di controllo e/o delle verifiche;
 - modalità di verifica (grafica e/o numerica) dell'osservanza delle regole e/o delle tolleranze prestabilite (manuale, su computer integrato con l'analizzatore, su computer esterno).
- g) Validazione e gestione delle situazioni di "fuori controllo":
- accettazione della serie;
 - gestione delle situazioni di "fuori controllo".
- h) Valutazioni a medio termine (e/o retrospettive):
- frequenza della valutazione;
 - parametri statistici verificati;
 - regole e limiti adottati;
 - modalità grafico/statistica della valutazione;
- i) Archiviazione:
- definizione dei dati da archiviare;
 - archiviazione elettronica/cartacea;
 - modalità di archiviazione e di accesso all'archivio;
 - durata dell'archiviazione ed eliminazione del materiale obsoleto.

1.3. ATTIVAZIONE DEL PROGRAMMA

Per l'attivazione del programma è necessario che esso sia stato illustrato dettagliatamente a tutti i membri del gruppo di lavoro coinvolti nell'esecuzione delle relative analisi e che questi abbiano mostrato di comprenderne i meccanismi ed il significato.

È necessario inoltre che si sia provveduto a predisporre e ad approvvigionarsi di tutto quanto necessario per la sua durata (per esempio 6 o 12 mesi, ma anche un solo mese in alcuni casi), come materiale di cancelleria, accessori e materiali per

computer, materiali di controllo. Per quanto concerne questi ultimi, nel caso in cui si utilizzino valori attesi determinati in laboratorio, è necessario che il periodo preliminare sia stato completato con successo. In termini più generali, si deve rammentare che, se viene a mancare qualcosa nel corso dell'esecuzione del programma, il medesimo fallisce in tutto o in parte.

Il programma deve rimanere attivo per tutto l'arco di tempo della sua validità, come indicato nella descrizione, e deve essere eseguito con le modalità riportate nella descrizione medesima. Modificazioni delle modalità di esecuzione, che possano rendersi necessarie per motivi di vario genere, devono essere accettate con estrema cautela, rammentando che esse in ogni caso rappresentano una modifica del programma e devono essere accompagnate da un corrispondente aggiornamento della descrizione, inclusi i limiti di tempo della loro validità.

1.4. ARCHIVIAZIONE DEI DATI

L'archiviazione dei dati, secondo le modalità e per i tempi specificati nella descrizione di ciascun programma, costituisce una caratteristica fondamentale del programma medesimo. Un aspetto fondamentale dell'archiviazione, che ne documenta la razionalità e l'appropriatezza tecnica, è che i dati archiviati siano sempre ed immediatamente consultabili da tutti gli addetti e da persone esterne in occasione di eventuali visite ispettive.

L'archiviazione dei dati del CQI ha fundamentalmente lo scopo di:

- a) documentare la regolare effettuazione del CQI;
- b) fornire una base per la valutazione, a medio-lungo termine, della stabilità dei sistemi analitici impiegati, consentendo una valutazione dell'affidabilità a lungo termine dei sistemi medesimi;
- c) fornire la tracciabilità di un risultato analitico relativo ad un paziente e alla situazione analitica vigente nel laboratorio nel momento in cui il dato medesimo è stato prodotto.

La metodologia di archiviazione deve essere scelta in vista degli scopi previsti.

L'archiviazione può avvenire su supporto magnetico o cartaceo: si consiglia l'utilizzo di entrambi. In ogni caso, come già rammentato, l'archiviazione deve essere ordinata, in modo da consentire una rapida consultazione di quanto desiderato.

Ai sensi della normativa vigente i dati del Controllo di Qualità Interno devono essere conservati almeno un anno.

PAGINA BIANCA

2.

PROGRAMMA “MINIMO” DI BIOCHIMICA CLINICA

2.1. Generalità: tipi di programma, analiti da includere	Pag. 13
2.2. Caratteristiche, scelta, approvvigionamento e predisposizione dei materiali	Pag. 13
2.3. Frequenza delle analisi di controllo, posizionamento del campione di controllo	Pag. 14
2.4. Presentazione dei risultati e valutazione immediata	Pag. 15
2.5. Presentazione grafica dei risultati (carte di controllo)	Pag. 15
2.6. Gestione delle situazioni di “fuori controllo” (non conformità)	Pag. 16
2.7. Valutazione a medio termine e/o retrospettiva	Pag. 17
2.8. Materiali da archiviare e durata dell’archiviazione	Pag. 18
2.9. Appendici	Pag. 19
Appendice 1. Periodo preliminare	Pag. 19
Appendice 2. Regole ed algoritmi	Pag. 20
2.10. Bibliografia	Pag. 22

PAGINA BIANCA

2.1. GENERALITÀ: TIPI DI PROGRAMMA, ANALITI DA INCLUDERE

Nell'ambito di ciascun laboratorio si devono attivare uno o più programmi, a seconda delle dimensioni del laboratorio, delle analisi normalmente eseguite di routine, della loro frequenza (o numero), della ripartizione tra sottosezioni o stazioni analitiche differenti. In linea di massima, in un laboratorio di Biochimica Clinica di medie dimensioni o nella sezione di Biochimica Clinica di un laboratorio "misto", con attività suddivisa in sottosezioni, si può considerare adatta l'attivazione di programmi separati per:

- a) **analiti comuni**: substrati, elettroliti, enzimi, in genere determinati in un'unica stazione analitica automatizzata. Nel caso di esecuzione dei medesimi esami in stazioni multiple (per esempio routine e urgenza) si attiveranno programmi separati per ciascuna stazione, anche se per le medesime analisi e con i medesimi materiali;
- b) **proteine** (se eseguite su stazione dedicata);
- c) **immunochimica marcata**: marcatori tumorali, farmaci, ormoni, droghe d'abuso, vitamine (folato e B12);
- d) **emogasanalisi**.

In linea di massima tutti gli analiti inclusi nel repertorio di una stazione analitica o di una sezione di laboratorio cui è dedicato un programma, devono essere inclusi nel programma medesimo. Possono fare eccezione:

- a) gli analiti per i quali il materiale non dia sufficienti garanzie di stabilità o di compatibilità con il sistema analitico;
- b) gli analiti la cui frequenza di determinazione sia occasionale o poco più o che comunque si discosti significativamente da quella con cui sono determinati gli altri analiti della stazione.

In questi casi adottare materiali od approcci alternativi.

2.2. CARATTERISTICHE, SCELTA, APPROVVIGIONAMENTO E PREDISPOSIZIONE DEI MATERIALI

Per ciascuno dei programmi minimi che si intende attivare si devono selezionare i materiali di controllo di volta in volta ritenuti più idonei. Questi possono essere materiali del commercio (liofilizzati o liquidi) o materiali preparati in laboratorio (per esempio miscele di sieri aliquotate e congelate): in ogni caso per le operazioni di controllo si devono impiegare materiali differenti da quelli usati per la calibrazione. La scelta dei materiali e delle relative condizioni di conservazione, nonché il giudizio sulla loro idoneità al singolo programma, sono responsabilità del direttore del laboratorio. La modalità di approvvigionamento, mediante acquisto, abbonamento, preparazione in laboratorio od altro, deve garantire la disponibilità di un materiale omogeneo per la durata di almeno sei mesi/un anno, nei limiti della stabilità prevista e compatibilmente con essa. È anche responsabilità del direttore del laboratorio stabilire, caso per caso, le modalità di predisposizione dei materiali, per esempio se

ricostituire ogni volta un flaconcino di liofilizzato oppure se suddividere il ricostituito in aliquote da conservarsi in condizioni definite e da utilizzarsi una alla volta. In ogni caso, tutte le operazioni coinvolte (ricostituzione, aliquotazione, conservazione delle aliquote, eventuale scongelamento, eccetera) devono essere dettagliatamente descritte ed osservate uniformemente.

L'aliquota di materiale che viene utilizzata per l'analisi di controllo rappresenta il campione di controllo: il valore analitico ottenuto per tale campione, in ogni singola occasione, viene indicato come il risultato di controllo.

Oltre alle ovvie caratteristiche di stabilità e di compatibilità con i rispettivi sistemi analitici, si devono considerare le seguenti caratteristiche:

- a) ambito dei valori attesi (di concentrazione o di altra grandezza oggetto di misura). In genere si devono utilizzare materiali a due valori, di cui uno rientrante nell'ambito dei valori di riferimento dell'analita sotto controllo, l'altro moderatamente o decisamente elevato (o, alternativamente, moderatamente o decisamente basso, a seconda delle modificazioni prevalenti previste nella patologia). Si devono evitare concentrazioni eccessivamente basse, dove l'elevata variabilità di un segnale debole può mascherare l'instaurarsi di instabilità del sistema. In ogni caso, i valori devono rientrare nell'intervallo di linearità o nell'intervallo analitico utile del metodo utilizzato;
- b) valori attesi. Si possono utilizzare valori forniti dall'industria per i relativi materiali, oppure valori assegnati in laboratorio, ottenuti in un periodo preliminare (vedi appendice 1). I valori attesi possono essere aggiornati nel corso dell'esecuzione del programma. In ogni caso, devono essere disponibili due parametri statistici:
 - un valore centrale di tendenza (in genere **media aritmetica**: "m");
 - una misura di dispersione (in genere **deviazione standard**: "ds").

Nel caso di utilizzo di valori forniti dall'industria deve essere esplicitato il valore statistico (per esempio una o più deviazioni standard) dell'intervallo comunicato.

I valori attesi sono di norma espressi nella medesima unità (concentrazione di massa o di sostanza, unità arbitrarie, eccetera) con cui sono riportati i risultati delle rispettive analisi. In casi particolari, ove manchi una definizione accettabile dell'unità o dove l'analita non è ben definito, possono essere rappresentati da un valore di misura strumentale (per esempio, assorbanza).

2.3. FREQUENZA DELLE ANALISI DI CONTROLLO, POSIZIONAMENTO DEL CAMPIONE DI CONTROLLO

La frequenza minima dell'analisi di controllo è di una al giorno, o una per serie analitica ove l'analisi non è eseguita tutti i giorni, e di almeno due al giorno dove si eseguono serie multiple nell'arco delle 24 ore (per esempio, laboratorio di urgenza).

Nell'ambito della serie analitica il campione di controllo dovrebbe essere inserito ogni volta in posizione casuale rispetto ai campioni sconosciuti. È possibile tuttavia

derogare da tale regola (inserendo il campione in una posizione più o meno costante) tenendo presente quanto segue:

- a) in caso di sistema analitico stabile, calibrato a cadenze fisse dilazionate (per esempio una volta la settimana), non è necessario osservare una stretta casualità;
- b) in caso di sistema analitico instabile e/o calibrato giornalmente, la casualità dell'inserimento acquista maggiore importanza e può essere opportuno optare per più di un'analisi di controllo per serie, inserendo i campioni di controllo per esempio a cadenza costante (un campione controllo ogni tot campioni in esame).

I protocolli operativi di alcune stazioni analitiche, oppure le abitudini convenzionali vigenti, possono prevedere che dopo ciascuna calibrazione si analizzi un campione di controllo per verificare la correttezza della calibrazione, onde intervenire eventualmente prima dell'analisi dei campioni. Tale procedimento, anche se effettuato utilizzando il medesimo materiale di controllo, non rappresenta il controllo statistico della serie analitica. Qualunque siano l'esito dell'analisi di controllo effettuata per verificare la correttezza della calibrazione e gli interventi attuati di conseguenza, un successivo campione di controllo deve essere inserito casualmente nella serie; solamente i valori ottenuti per tale campione devono essere utilizzati come parte del procedimento di CQI.

2.4. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI E VALUTAZIONE IMMEDIATA

In questo contesto "immediato" indica che la valutazione deve avvenire in un tempo sufficientemente breve da consentire la messa in opera di eventuali interventi correttivi prima della validazione (o della refertazione) dei risultati per i campioni sconosciuti analizzati contestualmente.

Per la sua valutazione, il risultato di controllo viene confrontato con i valori attesi, verificando se una o più delle regole stabilite in precedenza sono violate. In caso negativo la situazione è sotto controllo; la violazione di una o più regole segnala invece il verificarsi di una situazione di "fuori controllo" (ossia una "non conformità"), da gestire mediante opportuni interventi.

Le regole possono essere "semplici" o "multiple". Nel primo caso si deve verificare l'osservanza (o la violazione) delle singole regole, separatamente per ciascuno dei due risultati di controllo. Nel caso delle regole multiple la valutazione è maggiormente integrata, secondo un prestabilito algoritmo sequenziale. Le regole semplici e multiple ed i relativi algoritmi sono riportati nell'appendice 2.

2.5. PRESENTAZIONE GRAFICA DEI RISULTATI (CARTE DI CONTROLLO)

Per evitare il semplice confronto numerico del risultato di controllo con un intervallo prestabilito, ma per verificare invece l'osservanza di un sistema di regole (semplici o

multiple) comunque scelto, è di grande vantaggio ricorrere a quel tipo di supporto grafico che è rappresentato dalla “carta di controllo”. Senza la carta, la verifica non automatizzata elettronicamente dell’osservanza (o meno) delle regole è possibile, ma è assai più difficile e richiede più tempo. Le carte possono essere allestite ed aggiornate manualmente o con l’uso di programmi computerizzati.

Nell’allestire manualmente le carte di controllo bisogna tenere presenti le seguenti regole di massima:

- predisporre ciascuna carta per il periodo di circa un mese. Allo scadere del mese, il confronto dei primi valori del nuovo mese con gli ultimi del precedente può presentare qualche difficoltà;
- dare la giusta espansione all’asse delle ordinate (concentrazioni) in maniera tale che il valore medio sia abbastanza centrato ed i limiti $\pm 3ds$ siano comodamente inclusi;
- tracciare sulla carta le linee (orizzontali) corrispondenti alla media ed a $\pm 2ds$ e $\pm 3ds$; il posizionamento dei punti rispetto ai livelli corrispondenti a $\pm 1ds$ può essere stimato anche in assenza della linea;
- nel caso di due materiali a livelli differenti, le coppie di carte possono essere utilmente sovrapposte su un medesimo foglio.

L’allestimento delle carte ed il loro sistematico utilizzo possono essere facilitati dall’utilizzo di programmi di tabellone elettronico o di grafica computerizzata disponibili commercialmente. Tuttavia deve essere ben chiaro che si tratta di procedimenti che impegnano molto tempo e che pertanto rischiano di non essere seguiti sistematicamente.

Oggi sono invece disponibili programmi “ad hoc” per personal computer che, oltre a presentare automaticamente i dati in forma grafica corretta, verificano automaticamente l’osservanza o meno di regole prescelte. Il ricorso a tali programmi, oltretutto di facile uso, è l’unico modo pratico per operare secondo le regole su accennate. Tali programmi possono essere integrati nei programmi di gestione di alcuni strumenti, oppure possono essere utilizzati su un personal computer esterno, eventualmente collegato in linea con l’analizzatore per la trasmissione automatica dei risultati di controllo.

2.6. GESTIONE DELLE SITUAZIONI DI “FUORI CONTROLLO” (NON CONFORMITÀ)

Rappresenta l’aspetto che necessita di maggiore impegno professionale, nonché di maggiore conoscenza degli aspetti tecnici delle differenti analisi, per il quale peraltro non è possibile dare indicazioni di comportamento univoche. In teoria, il verificarsi del “fuori controllo” dovrebbe portare all’eliminazione di tutti i risultati generati contestualmente, seguita dalla ricerca e dalla rimozione delle cause e dalla ripetizione degli esami; in pratica tuttavia ciò non è quasi mai possibile.

In linea di massima si possono considerare le seguenti linee (indicative) di comportamento.

L'entità dello scostamento del(i) valore(i) di controllo dal valore atteso può essere valutata in relazione all'errore totale ammissibile per la specifica analisi, stabilito empiricamente dal responsabile in base alla propria esperienza clinica o, meglio, in base alla variabilità biologica. Se tale scostamento è giudicato piccolo (ancorché sufficiente a generare situazione di fuori controllo), oppure limitato ad un solo valore, si può procedere ad una verifica dei valori ottenuti per i campioni sconosciuti analizzati contestualmente. Se la distribuzione di questi ultimi è sostanzialmente regolare, il responsabile può decidere di:

- a) ignorare temporaneamente il segnale di fuori controllo. Ciò è in genere valido, se sono stati analizzati campioni sconosciuti in numero sufficientemente elevato e se si tratta di analiti soggetti di norma a variazioni modeste (tipicamente: sodio). In ogni caso, si deve sorvegliare con maggiore attenzione (per esempio raddoppiare il numero dei controlli) la serie analitica successiva;
- b) rianalizzare i controlli contestualmente ad un numero limitato di campioni incogniti: se i risultati di controllo non generano più situazione di fuori controllo, mentre i campioni incogniti forniscono risultati sovrapponibili ai precedenti, si può accettare la serie.

In ognuno di questi due casi l'analista si assume la responsabilità di una decisione in un certo senso contrastante con le proprie assunzioni preliminari, che tuttavia può essere giustificata sulla base di considerazioni organizzative (per esempio: meglio un risultato imperfetto che nessun risultato). Le decisioni assunte devono comunque essere registrate con una nota esplicativa della loro motivazione.

Se lo scostamento dei risultati di controllo dal valore atteso è giudicato significativo in base ai criteri su accennati, è necessario rianalizzare i campioni di controllo contestualmente ad un numero consistente di campioni sconosciuti. Se i valori di controllo rientrano nel previsto ed i valori dei campioni sconosciuti non si modificano fortemente, è possibile decidere per l'accettazione della serie analitica.

In caso di scostamento(i) decisamente marcato(i) del(i) valore(i) di controllo, soprattutto se accompagnato(i) da distribuzione decisamente irregolare dei valori per i campioni sconosciuti ("tutti bassi" oppure "tutti alti"), si deve sospendere la validazione dei valori analitici, indagare le possibili cause dell'anomalia (in genere a partire dalla calibrazione) e ripetere le analisi (campioni di controllo e campioni incogniti). Le modalità di questo intervento sono legate all'esperienza del responsabile ed alle caratteristiche del sistema analitico (per esempio modalità e frequenza della calibrazione) e non possono essere generalizzate.

2.7. VALUTAZIONE A MEDIO TERMINE E/O RETROSPETTIVA

A scadenze prefissate, in genere mensili o comunque quando siano disponibili almeno una ventina di risultati di controllo consecutivi, si eseguono valutazioni retrospettive, basate sostanzialmente sul calcolo di:

- a) media;
- b) deviazione standard;
- c) coefficiente di variazione (CV).

Le eventuali variazioni di tali parametri statistici nel corso di periodi successivi devono essere considerate ai fini di interventi sulla calibrazione, nonché sulla verifica di singole caratteristiche e sulla manutenzione dei sistemi analitici coinvolti.

Si rammenta che la significatività statistica delle eventuali differenze tra valori successivi della media o della deviazione standard può essere verificata, rispettivamente, con il test t di Student (differenza tra le medie) o con il test F di Fisher (differenza tra le deviazioni standard).

I valori di CV possono essere considerati come i valori tipici di imprecisione del laboratorio, nel determinato periodo e possono essere impiegati per esempio per il calcolo delle differenze critiche. Possono essere confrontati con i “traguardi per l'imprecisione” suggeriti da associazioni scientifiche e calcolati sulla base della variabilità biologica intra-individuo.

Gli scostamenti dei valori medi da valori convenzionali veri del materiale (se disponibili) possono essere considerati come una misura dell'errore sistematico (inaccuratezza) tipico del laboratorio nel medesimo periodo. Gli scostamenti sistematici dal valore vero convenzionale devono tuttavia essere considerati con estrema circospezione. Per contro, le variazioni statisticamente significative di valore medio tra periodi differenti, indicative di variazioni sistematiche e quindi di variazioni dell'accuratezza relativa, devono essere considerate attentamente per la messa in opera di opportuni provvedimenti.

2.8. MATERIALI DA ARCHIVIARE E DURATA DELL'ARCHIVIAZIONE

È opportuno archiviare:

- a) le carte di controllo relative a periodi di un mese o di 25/30 serie analitiche consecutive;
- b) una registrazione delle situazioni fuori controllo riscontrate, con una descrizione sintetica dei provvedimenti messi in atto;
- c) le eventuali variazioni dei procedimenti analitici/strumentazione e dei materiali di controllo;
- d) i parametri statistici della valutazione a medio termine, rappresentati dalle medie e dai CV, archiviati sotto forma di tabelle o di grafici o di entrambi.

Durata dell'archiviazione: almeno un anno.

2.9. APPENDICI

Appendice 1

Periodo preliminare

Il periodo preliminare ha lo scopo di stabilire i parametri statistici che definiscono i “valori attesi” di ciascuna grandezza di ciascun materiale di controllo.

Si ricorre al periodo preliminare quando:

- il materiale di controllo prescelto è preparato in laboratorio, oppure non dispone di valori assegnati dall'industria che lo ha eventualmente fornito;
- tali valori sono resi disponibili senza un'indicazione chiara del loro significato statistico (per esempio intervalli attesi non chiaramente specificati);
- a giudizio del responsabile è più opportuno utilizzare “valori del laboratorio” piuttosto che valori resi disponibili dall'industria;
- si utilizzi un materiale i cui valori assegnati sono relativi ad una strumentazione analitica differente da quella impiegata;
- non esiste una sicura definizione dell'unità in cui sono espressi i risultati e/o vi è carenza di standard accettati e materiali di riferimento certificati.

Per l'esecuzione corretta di un periodo preliminare è necessario disporre di un sistema analitico stabile e correttamente calibrato. L'ottenimento e la verifica di tali presupposti è cura del responsabile: a tale fine possono essere messi in opera accorgimenti differenti, a seconda del tipo di determinazione e/o di strumento.

Verificati tali requisiti, o nella presunzione che lo siano, si procede alla raccolta di venti/trenta risultati analitici (per ciascun componente e per ciascun controllo) ottenuti in altrettante serie analitiche (per lo più in altrettanti giorni differenti). Si dispongono i valori in ordine crescente e li si ispeziona per la presenza di eventuali valori aberranti. Anche se esistono metodi statistici per verificare se un valore estremo è aberrante, o meno, può essere sufficiente una valutazione approssimativa, verificando per esempio, ai due estremi, se la differenza tra l'ultimo ed il penultimo è assai maggiore della differenza tra il penultimo ed il terzultimo e così via. In linea di massima, lo scarto di valori considerati aberranti deve avvenire con estrema cautela. In presenza di uno o due valori aberranti, è consigliabile sostituirli con due nuovi valori analitici anziché scartarli.

Si procede quindi al calcolo della media aritmetica (m) e della deviazione standard (ds): i valori ottenuti rappresentano i parametri statistici per la costruzione delle carte di controllo e per il confronto dei valori ottenuti nel successivo periodo operativo del programma di controllo.

Programmi “ad hoc” per computer consentono l’esecuzione automatica delle operazioni di calcolo descritte.

Appendice 2

Regole ed algoritmi

a) Regole “semplici”:

- 2 su 3 valori di controllo consecutivi si posizionano all'esterno delle linee $m \pm 2ds$, nella medesima direzione;
- 4 su 5 valori di controllo consecutivi si posizionano all'esterno delle linee $m \pm 1ds$, nella medesima direzione (nota: tali linee non vengono normalmente tracciate sulla carta per semplicità);
- 7 valori di controllo consecutivi si posizionano sopra o sotto la linea della media (m);
- 7 valori di controllo consecutivi si dispongono in tendenza (crescente o decrescente) continua, pur potendo una linea che li colleghi attraversare la media;
- 1 valore di controllo si posiziona all'esterno delle linee $m \pm 3ds$.

Se nessuno dei due valori di controllo mostra uno dei comportamenti corrispondenti alle regole, si può concludere per “situazione sotto controllo” (accettare la serie); se l'uno o l'altro dei controlli mostra invece uno dei comportamenti elencati si conclude per “situazione fuori controllo” (rifiutare la serie, mettere in atto i procedimenti di gestione di non conformità).

b) Regole “multiple”:

- uno o l'altro dei due valori di controllo si posiziona all'esterno delle linee $m \pm 2ds$;
- uno o l'altro dei due valori di controllo si posiziona all'esterno delle linee $m \pm 3ds$;
- entrambi i valori di controllo si posizionano all'esterno delle linee $m \pm 2ds$ nella medesima direzione;
- un valore di controllo esterno alla linea $m + 2ds$, l'altro esterno alla linea $m - 2ds$ (la distanza tra i due valori risulta superiore a $4ds$);
- gli ultimi 4 valori di controllo ($2 + 2$) si posizionano all'esterno delle linee $m \pm 1ds$, nella medesima direzione;
- gli ultimi 10 valori di controllo ($5 + 5$) si posizionano sopra o sotto la linea della media (m).

Il comportamento dei valori di controllo rispetto alle regole su elencate viene esaminato sequenzialmente, secondo l'ordine previsto da un algoritmo, inizialmente

proposto da Westgard e del quale esistono alcune secondarie modificazioni, generando segnale di:

- “situazione sotto controllo” (accettare la serie);
- “situazione fuori controllo” (rifiutare la serie, mettere in atto i procedimenti di gestione di non conformità);
- “situazione di allarme” (in alcune modifiche dell’algoritmo originale: procedere a verifiche e manutenzione del sistema analitico).

Il procedimento delle regole multiple è considerato il più “potente” e quello in grado di generare il più ridotto numero di “falsi allarmi”. Si presta ottimamente alla gestione con un sistema computerizzato; ne è possibile anche una gestione manuale, che risulta tuttavia alquanto problematica, soprattutto se il sistema è applicato ad un numero elevato di esami.

2.10. BIBLIOGRAFIA

- Besozzi M, Bolelli G, Borsotti M, Leone L, Messeri G, Motta R, Prencipe L, Tocchini M. Il controllo di qualità in chimica clinica: le basi, gli obiettivi, il disegno. *Biochim Clin* 1996; 19: 372-400.
- Dybkaer R. Internal quality control in the clinical laboratory. *Biochim Clin* 1991; 15: 405-8.
- Fraser CG, Hyltoft Petersen P. The importance of imprecision. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 207-11.
- Franzini C. Requisiti qualitativi auspicabili per le prestazioni rese dal laboratorio di Biochimica Clinica. *Biochim Clin* 1998; 22: 42-7.
- Gruppo di Lavoro sull'Armonizzazione dei Sistemi Qualità e Accredimento della Confederazione di Chimica Clinica delle Comunità Europee. Criteri essenziali ed aggiuntivi per i sistemi qualità dei laboratori medici. (traduzione a cura di Domenico Laterza e Gabriella Trucco). *Biochim Clin* 1998; 22: 674-98.
- Hyltoft Petersen P, Ricos C, Stockl D, Libeer JC, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Thienpont L. Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 983-99.
- IFCC-Comitato di esperti per il controllo di qualità in chimica clinica. Controllo di qualità in chimica clinica. Traduzione italiana dei documenti IFCC. Ristampa dell'edizione 1981. *Biochim Clin* 1992; 16: 411-59.
- Jenny RW, Jackson-Tarentino KY. Causes of unsatisfactory performance in proficiency testing. *Clin Chem* 2000; 46: 89-99.
- Stockl D, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Libeer JC, Hyltoft Petersen P, Ricos C. Desirable routine analytical goals for quantities assayed in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 157-69.

Il Controllo di Qualità Interno in Biochimica Clinica

- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Proposed selected method. A multi-rule Shewart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem 1981; 27: 493-501.

3.

PROGRAMMA “MINIMO” DI EMATOLOGIA E COAGULAZIONE

3.1. Ematologia	Pag. 25
3.1.1. Generalità: analiti da includere	Pag. 25
3.1.2. Tipi di programma di CQI	Pag. 26
3.1.2.1. Metodo con campione di controllo	Pag. 26
3.1.2.2. Metodo dell'analisi replicata nella serie o ripetuta in giorno successivo	Pag. 27
3.1.2.3. Metodo della media mobile	Pag. 28
3.1.3. Scelta ed applicazione del tipo di programma	Pag. 29
3.1.4. Gestione delle situazioni di “fuori controllo” (non conformità)	Pag. 29
3.1.5. Archiviazione	Pag. 30
3.2. Coagulazione	Pag. 31
3.2.1. Generalità: tipi di programma, analiti da includere	Pag. 31
3.2.2. Caratteristiche, scelta, approvvigionamento e predisposizione dei materiali	Pag. 31
3.2.3. Frequenza delle analisi di controllo, posizionamento del campione di controllo	Pag. 32
3.2.4. Presentazione dei risultati e valutazione immediata	Pag. 32
3.2.5. Presentazione grafica dei risultati (carte di controllo)	Pag. 33
3.2.6. Gestione delle situazioni di “fuori controllo”	Pag. 34
3.2.7. Valutazione a medio termine e/o retrospettiva	Pag. 35
3.2.8. Archiviazione: materiali da archiviare e durata dell'archiviazione	Pag. 35
3.3. Bibliografia	Pag. 36

PAGINA BIANCA

3.1. EMATOLOGIA

3.1.1. GENERALITÀ: ANALITI DA INCLUDERE

In questa sezione viene discusso il programma minimo di CQI da applicare al gruppo di misure incluse nel così detto “esame emocromocitometrico”, ed eventualmente alla misura della velocità di eritrosedimentazione (VES).

L'esame emocromocitometrico include una serie di misure “dirette” ed una serie di parametri ematologici calcolati, eseguiti automaticamente su tutti i campioni analizzati. Le misure dirette comprendono: la concentrazione di emoglobina; il numero di eritrociti, di leucociti e di piastrine; l'ematocrito o alternativamente il volume globulare medio (MCV). I parametri ematologici calcolati automaticamente dalle misure dirette includono: l'MCV o alternativamente l'ematocrito, l'emoglobina eritrocitaria media (MCH), la concentrazione emoglobinica eritrocitaria media (MCHC), la dispersione dei volumi eritrocitari (RDW). Molti analizzatori automatici attualmente utilizzati forniscono inoltre una valutazione quantitativa, espressa in termini percentuali, delle varie categorie di leucociti (conteggio differenziale o formula leucocitaria) e dei reticolociti.

Per il CQI statistico dei parametri ematologici (misurati direttamente o calcolati) si possono utilizzare diversi tipi di programma, basati rispettivamente su:

- a) analisi giornaliera di un adatto campione di controllo;
- b) analisi replicata nella medesima serie di uno (o più) campione(i) appositamente selezionato(i);
- c) analisi ripetuta di uno (o più) campione(i) analizzato(i) il giorno precedente, opportunamente selezionato(i) e conservato(i);
- d) oscillazione della “media mobile” dei valori ottenuti per i campioni in esame (campioni da paziente) analizzati giornalmente, calcolata mediante adatto algoritmo.

La necessità o l'opportunità di ricorrere a tipi di programma di CQI diversi da quello di cui al punto a) derivano sostanzialmente dalla criticità del materiale di controllo. Il materiale di controllo, di cui l'aliquota utilizzata rappresenta il campione di controllo, deve infatti rispondere ai due requisiti principali della stabilità e della compatibilità con il sistema analitico (strumento e relativi reagenti) utilizzato. Questo ultimo requisito risulta particolarmente critico in quanto, per motivi di stabilità, i materiali disponibili risultano più o meno differenti dal sangue umano fresco e possono quindi dare risposte differenti con i differenti strumenti, in base ai differenti principi utilizzati per le misure. D'altra parte il sangue umano nativo (non modificato) non presenta sufficiente stabilità per essere utilizzato in questo tipo di programma.

In considerazione di quanto sopra, per l'attuazione di programmi di cui al punto a) l'unica via praticamente percorribile prevede l'uso di materiali commerciali, forniti dalla medesima ditta del sistema analitico o, se da altra ditta, dichiarato compatibile con il sistema analitico medesimo: le ditte forniscono materiali adatti, di stabilità generalmente compresa tra 3 e 6 mesi. Considerazioni sostanzialmente identiche

sono valide per quanto concerne i possibili materiali per il CQI della misura della VES.

3.1.2. TIPI DI PROGRAMMA DI CQI

Vengono qui descritte, sinteticamente, le modalità attuative dei differenti tipi di programma di VEQ applicabili in ematologia.

3.1.2.1. METODO CON CAMPIONE DI CONTROLLO

- a) Materiale di controllo. Scelto il materiale commerciale adatto, se ne deve predisporre la disponibilità di un lotto omogeneo (acquisto od abbonamento) nella quantità adatta per il suo utilizzo nell'arco di tempo della sua stabilità massima dichiarata. Il materiale acquisito deve essere conservato nelle condizioni prescritte. Si devono utilizzare materiali a due livelli dei differenti parametri ematologici (in genere "normale" e "patologico", questo ultimo preferibilmente basso). L'utilizzo eventuale di materiali a tre livelli consente ulteriori verifiche, per esempio quella della linearità.
- b) Valori assegnati. Si utilizzano i valori attesi dei differenti parametri ematologici assegnati al materiale commerciale, specifici per il sistema analitico. Essi sono rappresentati da un valore centrale e da un intervallo di dispersione: deve essere specificato il valore statistico (per esempio numero di deviazioni standard) dell'intervallo di dispersione riportato. È possibile, in alternativa, effettuare un "periodo preliminare", in condizioni di stabilità del sistema analitico, per assegnare valori e relative dispersioni al materiale (vedi appendice 1 al CQI in chimica clinica): ciò tuttavia consuma una porzione significativa del tempo di stabilità del materiale medesimo.
- c) Allestimento delle carte di controllo. Per ciascun parametro ematologico sotto controllo con il programma, e per ciascun livello, si allestiscono carte di controllo valide per un mese, riportando linee orizzontali corrispondenti a $m + 3ds$, $m + 2ds$, m , $m - 2ds$, $m - 3ds$. Si deve dare opportuna espansione all'asse delle ordinate, in modo che le linee estreme ($m + 3ds$ e $m - 3ds$) siano abbastanza prossime alle estremità verticali della carta.
- d) Periodo di attuazione. La durata del periodo di attuazione coincide sostanzialmente con quella della stabilità del materiale. Giornalmente, od in occasione di ciascuna serie analitica, si analizza una aliquota di ciascun materiale di controllo (campioni di controllo), inseriti in posizione casuale nella serie. I valori di controllo vengono annotati e riportati sulla carta di controllo, manualmente o automaticamente con sistemi elettronici a differente grado di evoluzione, per la valutazione immediata.
- e) Valutazione immediata. La posizione assunta dai valori di controllo in relazione alle linee sulla rispettiva carta viene valutata con riferimento a "regole" preventivamente adottate, scelte tra le varie disponibili (vedi appendice 2 al CQI in chimica clinica). La violazione di una o più regole rappresenta una situazione

di “fuori controllo”. Tra le violazioni cui si deve assegnare particolare importanza ed attenzione sono da menzionare un valore esterno all'intervallo $m \pm 3ds$ e 7 (o più) valori consecutivi compresi tra $m \pm 1ds$ e $m \pm 2ds$ dalla stessa parte rispetto alla media.

- f) Valutazione a medio o lungo termine. Ad intervalli predefiniti (per esempio un mese o 25-30 serie analitiche successive) si calcolano le medie e le deviazioni standard dei valori ottenuti per ciascuno dei parametri sotto controllo e dei materiali di controllo. Tali parametri statistici possono essere utilizzati per l'allestimento di nuove carte per il periodo successivo. Per la valutazione della stabilità a lungo termine del sistema, la significatività statistica delle eventuali differenze tra medie (dei valori ottenuti con il medesimo lotto di materiale) e deviazioni standard (anche di valori ottenuti con lotti di materiale differenti) successive può essere provata con il t di Student (differenza tra le medie) e con il test F di Fisher (differenze tra le deviazioni standard). È anche possibile costruire carte dei valori medi e delle deviazioni standard mensili.

3.1.2.2. METODO DELL'ANALISI REPLICATA NELLA SERIE O RIPETUTA IN GIORNO SUCCESSIVO.

- a) Materiali. I campioni di controllo sono rappresentati da una coppia di campioni in esame della routine giornaliera, selezionati in maniera da comprendere un valore normale ed un valore patologico dei principali parametri ematologici da controllare (per esempio eritrociti, emoglobina, leucociti). Sono da evitare, specialmente nel caso di analisi ripetute in giorni successivi, campioni suscettibili di instabilità, come campioni da paziente leucemico, con agglutinine a freddo, parzialmente emolizzati, eccetera. Nel caso di analisi replicata nella serie il campione rimane sul banco, nel caso di analisi ripetuta in giorno successivo va conservato in frigorifero (2-8° C).
- b) Periodo preliminare; allestimento delle carte di controllo. La variabile soggetta a controllo statistico è la differenza [“delta” (δ) o “range” (R)] tra coppie di valori: il suo ambito di variazione in condizioni di stabilità del sistema analitico deve essere stabilito in un periodo preliminare, come segue. In un periodo di circa 15 giorni si seleziona e si conserva una coppia di campioni come sopra, analizzandoli giornalmente in doppio e/o conservandoli per rianalizzarli il giorno successivo. Si ottengono così, per ciascun parametro ematologico, 30 coppie di valori replicati o ripetuti, per le quali si calcolano le 30 differenze [(2° risultato) - (1° risultato)], in valore assoluto ed espresse nell'unità caratteristica di ciascun parametro. L'ambito di variazione delle differenze può essere descritto e rappresentato graficamente in due modi. Nel primo, più semplice e da applicare alle differenze tra i valori replicati nella serie, si calcolano la media (\bar{R}) dei valori assoluti (ossia, senza segno) delle 30 differenze ed il valore ($3,3 \times \bar{R}$) come limite entro il quale sono incluse oltre il 99 % delle differenze. Si allestisce quindi una carta di controllo mensile, assegnando la variabile “differenza” all'asse delle

ordinate, al quale ultimo si dà l'opportuna espansione, da 0 a poco più del valore $(3,3 \times \bar{R})$. Sulla carta si tracciano righe orizzontali a livello di (\bar{R}) e di $(3,3 \times \bar{R})$. Nel secondo, da applicare alle differenze tra valori ripetuti in giorni successivi, si calcola la media (che dovrebbe essere assai vicina a zero) e la deviazione standard delle 30 differenze, prese questa volta con il loro segno. Si allestiscono quindi carte di controllo mensili, nelle quali all'asse delle ordinate sono assegnati i valori delle differenze, tracciando su di esse le linee orizzontali a livello della media e della media più o meno 2 e 3 ds.

- c) Periodo di attuazione e valutazione immediata. Il periodo di attuazione non ha ovviamente limiti di tempo dettati dalla stabilità del campione. Ogni giorno, od in occasione di ciascuna serie analitica, si seleziona una coppia di campioni già analizzati, per una ripetizione dell'analisi nella medesima serie od il giorno successivo. Si calcolano quindi le differenze e le si riportano sulla rispettiva carta. Per quanto concerne i risultati dell'analisi replicata nella serie, la situazione di fuori controllo è rappresentata dal superamento della linea corrispondente a $(3,3 \times \bar{R})$. Per quanto concerne i risultati dell'analisi ripetuta il giorno successivo, si adottano le regole statistiche come su menzionato (paragrafo 3.1.2.1).
- d) Valutazione a medio e lungo termine. Ad intervalli mensili si ricalcolano i valori medi delle differenze (analisi replicata nella serie) e le medie e le deviazioni standard delle differenze (analisi ripetuta il giorno successivo): tali nuovi parametri statistici possono essere utilizzati per l'aggiornamento delle carte di controllo da utilizzare nel mese successivo. A partire dalle coppie di valori (nella serie e tra giorni) è possibile calcolare l'imprecisione (mensile) del metodo, rispettivamente nella serie e tra giorni. Si rammenta che la deviazione standard descrittiva dell'imprecisione del metodo deve essere in questo caso calcolata con la formula: $[ds = (\sum \delta^2 / 2N)^{1/2}]$, dove δ rappresenta la differenza tra i due valori di ciascuna coppia ed N il numero delle coppie. Dai valori di ds possono essere generati i valori di CV (in unità %) con la formula $[CV = 100 \times ds/m]$, dove m è la media di tutti i valori (assoluti) delle coppie. Eventuali variazioni significative dell'imprecisione possono essere verificate esaminando con il test F di Fisher la significatività statistica delle eventuali differenze tra valori successivi di ds. I metodi basati sull'analisi replicata o ripetuta non sono sensibili nel rilevare variazioni di accuratezza: è tuttavia importante osservare sulle carte il possibile instaurarsi di tendenze.

3.1.2.3. METODO DELLA MEDIA MOBILE

È una variante del metodo della media dei valori giornalieri (o dei valori normali giornalieri), di possibile applicazione generale ma particolarmente adatto a grandezze assai costanti nei soggetti (normali ma anche patologici) che costituiscono la maggioranza dei campioni analizzati in una serie analitica. Tra i parametri ematologici risultano particolarmente adatti a questo tipo di controllo gli "indici eritrocitari" calcolati, MCV, MCH ed MCHC. L'algoritmo proposto da Bull è

particolarmente adatto. Tale algoritmo consente di calcolare a cadenze prefissate, per esempio ogni 20 campioni analizzati in successione, una media ponderata aggiornata (ossia “mobile”) dei valori degli indici. Il meccanismo di “ponderazione” assegna tanto minore peso al singolo valore quanto più questo si allontana dalla media calcolata sui valori precedenti. Il metodo sarebbe in grado di evidenziare variazioni sistematiche anche solo di 1% nelle misure dirette sulle quali sono calcolati gli indici. Può dare informazioni errate qualora, casualmente, il gruppo di 20 campioni includa numerosi campioni con alterazioni significative di un indice (per esempio, talassemici con riduzione patologica di MCV).

3.1.3. SCELTA ED APPLICAZIONE DEL TIPO DI PROGRAMMA

La scelta del tipo di programma da attuare, in relazione ai differenti parametri ematologici misurati, è responsabilità professionale del dirigente e viene orientata dalle caratteristiche della strumentazione, dal tipo di gestione elettronica dei dati e dalla disponibilità dei materiali di controllo.

In linea di massima, si deve attuare, di base, un programma con campione di controllo: il numero di parametri ematologici da includere è condizionato dalla disponibilità, o meno, di un sistema elettronico per l'acquisizione automatica dei dati di controllo, per l'allestimento delle carte e la segnalazione delle situazioni di fuori controllo. Se tale sistema non è disponibile, si deve comunque applicare tale metodo ai parametri misurati direttamente (emoglobina, eritrociti, leucociti, MCV o ematocrito, piastrine). Considerando due materiali e cinque parametri, ciò genera dieci carte di controllo: un numero superiore di carte può essere difficile da gestire manualmente o anche con un PC esterno, non in linea con l'analizzatore.

Anche la determinazione della VES può essere controllata con l'approccio del metodo con materiale di controllo a due livelli.

In ogni caso si ritiene opportuno associare quanto meno un controllo basato sull'analisi ripetuta il giorno successivo, limitato eventualmente ai parametri di maggiore rilievo. Questo approccio non può essere applicato alla VES, i cui campioni non sono stabili per 24 ore; il metodo dell'analisi replicata nella serie può invece essere applicato.

Il metodo della media mobile (algoritmo di Bull) può invece essere applicato, in aggiunta, se tale algoritmo è disponibile in linea sul sistema di gestione elettronica, “interno” od “esterno” all'analizzatore.

In ogni caso è fondamentale che i programmi, una volta selezionati, siano applicati con assoluta costanza, documentandone appropriatamente i risultati.

3.1.4. GESTIONE DELLE SITUAZIONI DI “FUORI CONTROLLO” (NON CONFORMITÀ)

Anche la gestione delle situazioni di fuori controllo, in relazione ai differenti parametri ematologici ed al tipo di programma che la hanno evidenziata, è responsabilità

professionale del dirigente e non è possibile indicare linee di azione universalmente valide.

In linea di massima il verificarsi di una situazione di fuori controllo indica una variazione non accettabile delle caratteristiche analitiche del sistema (instabilità del sistema analitico) e quindi obbliga al rifiuto dei risultati e ad interventi di manutenzione straordinaria dell'analizzatore prima di proseguire o di ripetere la serie di analisi.

Deroghe da interventi drastici possono essere responsabilmente decise dal dirigente in base a: possibile diversità dei segnali forniti da metodi contemporaneamente in atto; entità dello scarto registrato in relazione sia alla possibilità di efficace intervento immediato, sia all'urgenza clinica di fornire un risultato anche se imperfetto; sostanziale accettabilità clinica dei risultati ottenuti segnalata per esempio da un buon andamento dell'algoritmo di Bull.

In ogni caso:

- a) le decisioni assunte devono essere giustificate e documentate;
- b) si deve provvedere quanto prima alla ripetizione dell'analisi del campione di controllo e di un congruo numero di campioni in esame, verificando se si osservano variazioni solo per il primo, per i secondi o per entrambi;
- c) passata una eventuale emergenza, i segnali di fuori controllo non devono essere trascurati e devono dare luogo all'esecuzione di ripetuti controlli e ad interventi attenti di revisione della strumentazione. L'intervento della ditta fornitrice per operazioni di manutenzione e di ricalibrazione della strumentazione deve essere richiesto e documentato nelle sue modalità e nei suoi esiti.

3.1.5. ARCHIVIAZIONE

L'archiviazione dei risultati di CQI deve essere preceduta da una accurata registrazione delle decisioni prese in relazione ai tipi di programma da attivare e agli analiti o parametri ematologici da includere in ciascuno di essi.

In base al concetto di base di archiviare ordinatamente ed in maniera tale da assicurare un rapido accesso a dati di interesse, si stabilisce il materiale da archiviare e la modalità di archiviazione (cartacea, elettronica o entrambe).

Pur non potendo dare, anche in questo caso, indicazioni universalmente valide e, salvo eventuali differenti requisiti di legge, si richiama l'attenzione sui seguenti punti:

- i dati riguardanti le oscillazioni giornaliere e quelli relativi alle valutazioni a più lungo termine (medie e variabilità mensili) vanno archiviati almeno per un anno;
- le archiviazioni devono evidenziare le eventuali variazioni di strumentazione e di modalità analitiche intercorse;
- devono essere ordinatamente archiviate le situazioni di fuori controllo che hanno dato luogo ad intervento e gli interventi effettuati.

3.2. COAGULAZIONE

3.2.1. GENERALITÀ: TIPI DI PROGRAMMA, ANALITI DA INCLUDERE

L'affidabilità del risultato di laboratorio è legata a diversi fattori, primo tra tutti il controllo dell'errore di laboratorio (sistematico o casuale). Negli esami di coagulazione, tuttavia, l'introduzione di controlli di qualità (interni e esterni) è comunque insufficiente a garantire l'affidabilità del risultato se non si mantengono sotto controllo anche tutte le variabili che sono a monte e a valle della fase analitica propriamente detta, cioè le cosiddette fasi pre-analitica e post-analitica.

Nella fase pre-analitica molto importante è il controllo dell'esecuzione del prelievo, della provetta e del tipo di anticoagulante utilizzato.

Nell'ambito di ciascun laboratorio deve poi essere attivato un programma di monitoraggio delle caratteristiche di esecuzione dell'analisi, quali precisione e accuratezza, in modo che l'operatore possa mettere in evidenza eventuali performance analitiche insoddisfacenti e prendere la decisione di accettare o rigettare i dati dei pazienti.

Il controllo di qualità è essenzialmente un'analisi di routine di materiali di controllo stabili, il più possibile simili ai campioni da analizzare.

È compito di ogni singolo laboratorio fissare limiti e regole scritte che devono essere rispettate, in modo da misurare e monitorare imprecisioni e deviazioni su base giornaliera, mensile o a lungo termine.

Il controllo di qualità intralaboratorio prevede inoltre la revisione periodica e accurata degli apparecchi e la verifica che i reattivi siano ricostituiti secondo le istruzioni date dalle ditte produttrici.

Un programma minimo di controllo di qualità della coagulazione consiste nel monitoraggio di PT (Prothrombin Time), aPTT (Activated Partial Thromboplastin Time), Fibrinogeno e Antitrombina, test di base per la valutazione dei parametri coagulativi.

3.2.2. CARATTERISTICHE, SCELTA, APPROVVIGIONAMENTO E PREDISPOSIZIONE DEI MATERIALI

Per ottenere una precisione e un'accuratezza soddisfacenti nella stima dei parametri coagulativi occorre organizzare il monitoraggio di:

- a) raccolta dei campioni di plasma;
- b) separazione e conservazione del plasma;
- c) ottimizzazione dell'esecuzione analitica;
- d) scelta dei plasmi di riferimento e di controllo;
- e) espressione uniforme dei risultati;
- f) scelta dei reattivi;
- g) determinazione degli intervalli di riferimento della normalità.

I materiali utilizzati in un controllo di qualità dovrebbero essere il più possibile simili ai campioni da testare. I materiali dovrebbero essere gli stessi almeno per un anno,

dovrebbero essere stabili nel periodo di utilizzo e mostrare la minor variabilità possibile tra confezioni diverse.

Come riferimento è preferibile utilizzare un pool di plasmi freschi oppure rapidamente e attentamente congelati e mantenuti a -20°C , prelevati a soggetti normali. In alternativa è possibile l'utilizzo di plasmi di riferimento liofilizzati del commercio.

I campioni di CQI devono essere trattati (caricati, acquisiti ed elaborati) come tutti gli altri campioni. Se un test è calibrato, il materiale di controllo deve essere diverso dal calibratore.

Si deve misurare e confrontare con i valori clinici dei pazienti un minimo di due concentrazioni di ogni analita.

Nel caso dell'utilizzo di prodotti commerciali è compito del direttore del laboratorio stabilire le modalità di predisposizione dei materiali, per esempio se ricostituire ogni volta un flaconcino di liofilizzato oppure se suddividere il ricostituito in aliquote da conservarsi in condizioni definite e da utilizzarsi una alla volta. In ogni caso, tutte le operazioni coinvolte (ricostituzione, aliquotazione, conservazione delle aliquote, eventuale scongelamento, ecc.) devono essere descritte dettagliatamente e osservate.

3.2.3. FREQUENZA DELLE ANALISI DI CONTROLLO, POSIZIONAMENTO DEL CAMPIONE DI CONTROLLO

Si analizzano un minimo di due campioni di controllo di concentrazioni diverse almeno una volta ogni serie analitica, dove per serie analitica si intende una serie di misure entro cui l'accuratezza e la precisione del sistema di misurazione è stabile, o almeno una volta ogni 40 campioni.

È compito del costruttore definire l'ampiezza di una serie durante la quale il sistema analitico (strumenti e reagenti) dimostra di essere stabile. Parametri importanti da considerare sono i flussi di lavoro, la stabilità del campione e gli intervalli entro cui si collocano i risultati dei pazienti.

I controlli vanno inseriti in posizioni fisse (es. inizio e fine di una serie) oppure random tra i campioni.

- L'inserimento in posizioni fisse permette una valutazione dello spostamento in una serie.
- Il posizionamento random dà una valutazione più valida dell'imprecisione dei dati del paziente ed è da preferire.

3.2.4. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI E VALUTAZIONE IMMEDIATA

Ogni singolo laboratorio deve determinare i propri valori di riferimento. Gli intervalli di controllo forniti dal costruttore devono essere utilizzati come linee guida.

Partendo da un minimo di 20 valori ottenuti da un minimo di 20 serie separate si calcolano i valori medi. Se il carico di lavoro del laboratorio è piccolo potrebbero essere utilizzate meno di 20 serie, considerando non più di 3 valori di ogni serie.

Qualora venga utilizzato un nuovo lotto di materiale, deve essere utilizzato in parallelo al lotto corrente.

Una volta fissati i valori medi di riferimento, devono essere determinati i limiti di affidabilità attorno alla media. Se il risultato del controllo si pone entro i limiti stabiliti, si assume che lo strumento funzioni correttamente. Se il risultato del controllo si pone al di fuori di certi limiti, si assume che lo strumento non funzioni bene fino al momento in cui sia identificata la sorgente del problema. I risultati dei campioni di controllo devono rispettare i criteri di accettabilità del laboratorio prima che vengano validati i risultati dei test dei pazienti. L'approccio tradizionale per fissare i valori di riferimento è il metodo statistico. Viene calcolata la media e definiti i limiti di accettabilità attorno alla media corrispondenti a più o meno 2 deviazioni standard ($\pm 2ds$).

Un altro approccio prevede l'utilizzo dei limiti di utilità medica. Questo significa che il direttore del laboratorio definisce i limiti di controllo in un intervallo che corrisponde alla capacità del clinico di trattare adeguatamente il paziente. Gli intervalli possono essere fissati ad esempio entro 2,5 deviazioni standard. Questo è un metodo del tutto empirico.

È buona pratica di laboratorio effettuare la valutazione del controllo di qualità con cadenza giornaliera. Media e deviazione standard possono essere ricalcolate ogni giorno e confrontate con i valori target e con i valori ottenuti precedentemente. Si deve inoltre tenere conto del trend dei valori ottenuti.

Se i valori non hanno subito variazioni non è richiesta nessuna azione correttiva. Qualora invece si verifichi una differenza significativa dai dati originari, la situazione deve essere approfondita e intraprese azioni correttive che devono essere documentate.

3.2.5. PRESENTAZIONE GRAFICA DEI RISULTATI (CARTE DI CONTROLLO)

Una carta di controllo, quale la carta di Levey-Jennings, è frequentemente utilizzata per la rielaborazione dei dati del controllo di qualità. Questa deve riportare media e 2 linee di ds sopra e sotto la media. In accordo con la statistica gaussiana, le due linee di ds indicano l'area entro cui devono cadere il 95,5% dei valori. I valori ottenuti da un singolo numero di lotto di controlli dovrebbe mostrare una distribuzione abbastanza uniforme di punti sopra e sotto la media. Una volta, approssimativamente ogni 20 test, può succedere che un valore cada al di fuori dal range di 2ds (di solito tra 2 e 3ds). In genere questo succede per caso e non necessariamente indica una situazione fuori controllo. Ripetendo la determinazione sul campione o ricostituendo un nuovo flacone di controllo si otterranno di nuovo valori di normalità.

Per mezzo delle carte di Levey-Jennings è possibile anche il monitoraggio di variazioni e tendenze: si considera una variazione quando sette punti cadono sopra o sotto la media. Sono di solito causati da eventi quali una variazione nella calibrazione o nel valore di riferimento.

Una tendenza è vista quando sette valori aumentano o diminuiscono in modo costante. Ciò è generalmente causato da una variazione in un reagente, un controllo o in uno strumento.

Qualora si presenti un errore su un unico materiale di controllo, fonte del problema è, probabilmente, il controllo stesso. Se invece si presenta su più di un controllo, probabilmente è dovuto a un errore di sistema, quale calibrazione, reagenti o pipettamento.

3.2.6. GESTIONE DELLE SITUAZIONI DI “FUORI CONTROLLO”

Ogni laboratorio deve fissare delle linee guida per il CQI.

Ogni regola ha la funzione di rilevare il verificarsi di errori. La combinazione di più regole, in grado di rivelare sia errori casuali, sia sistematici ha come obiettivo il miglioramento della qualità del laboratorio. Questo dovrebbe condurre a non rigettare in modo sconsiderato serie in cui si siano ottenuti errori casuali.

La prima regola da adottare è quella di calcolare una media target, ottenuta attraverso serie multiple del materiale di controllo, e i limiti attorno alla media. Si ottengono delle situazioni di fuori controllo ad esempio qualora:

- a) Un punto si posiziona al di fuori di $\pm 2ds$ rispetto al controllo: sono necessari nuovi approfondimenti.
- b) Un punto si posiziona al di fuori di $\pm 3ds$ rispetto al controllo: la serie deve essere rigettata.
- c) Due dati consecutivi eccedono lo stesso limite, la media più $2ds$ o la media meno $2ds$. Questa regola è applicata sia a due livelli di controlli entro la medesima serie, sia a due risultati consecutivi dello stesso materiale di controllo in due serie diverse. In ogni caso bisogna rigettare la serie.

In generale, quando i risultati ottenuti sui plasmi di controllo cadono oltre le $\pm 3ds$, oppure tendono a collocarsi esclusivamente al di sopra o al di sotto della media entro le $\pm 2ds$, allora si deve presumere nel primo caso una non corretta esecuzione analitica o un'alterazione avvenuta nei reattivi, nel secondo caso una loro degradazione. Una volta che sia stato identificato il problema, il laboratorio deve intraprendere azioni correttive che devono essere documentate.

Qualora il singolo controllo dia un errore, questo deve essere di nuovo analizzato. Se il nuovo risultato è accettabile, i risultati dei pazienti possono essere accettati. Se ancora una volta il risultato del controllo non è accettabile, l'operatore deve individuare la causa dell'imprecisione. In ogni caso, entrambi i dati devono essere documentati.

In ogni caso le regole devono essere applicate prima che vengano analizzati i dati dei pazienti.

3.2.7. VALUTAZIONE A MEDIO TERMINE E/O RETROSPETTIVA

È opportuno rivalutare i dati di controllo di qualità su base mensile. Media e deviazione standard dovrebbero essere ricalcolate mensilmente utilizzando i dati del mese precedente.

Se i dati non sono variati significativamente, non è richiesta nessuna azione. Qualora invece si ottengano dei dati differenti dai dati originari, la situazione deve essere investigata e azioni correttive intraprese.

3.2.8. ARCHIVIAZIONE: MATERIALI DA ARCHIVIARE E DURATA DELL'ARCHIVIAZIONE

Il laboratorio deve documentare e mantenere i record cartacei e su supporto informatico dei dati di CQI per almeno un anno. Sarebbe utile archiviare su supporto informatico per periodi più lunghi l'andamento del CQI dei principali analiti, in modo da evidenziare le variazioni sistematiche dovute all'introduzione di sistemi analitici diversi.

La registrazione deve includere anche l'identità della persona o delle persone che hanno effettuato i controlli. In caso di non conformità dovrà essere registrato anche il provvedimento correttivo assunto.

3.3. BIBLIOGRAFIA

- Aulexa JL. Vives Corrons criterios y algoritmos de validacion informatica en el laboratorio de hematologia. Sangre 1998; 43 (5): 451-60.
- European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS). International Quality Control in Haematology 1987; 4: n 2, sez 4.
- First international conference on advances in clinical haematology: Current practice and future directions for Quality Assessment in Laboratory Haematology. Ed. J.A. Koepke and J.M. England. Clin Lab Haemat 1990; 12, Suppl.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance goals for international Quality Control of multichannel hematology analyzers; Approved Standard H26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1996.
- Bugiardini G, Bongiovanni F, Bertoli, F, Callivà R, Guariento A, Gaspari G, Motta R., Platè L. Il mantenimento del grado di efficienza dei Laboratori di Chimica Clinica, di Ematologia e di Emocoagulazione. Ortho Diagnostic Systems 1982; 52-60
- De Lucia D. Quality Control (Practical applications for the clinical laboratory. instrumentation) Laboratory 1995; 8: 3-11.
- Westgard JO, Burnett RW, Cooper WG, Graham GA, Hearn TL, Parvin CA, Parker DR. Statistical Quality Control for quantitative measurements: principles and definitions; Approved Guideline. Second Edition, NCCLS, 1999; 19(5): 1-9

4.

PROGRAMMA “MINIMO” DI IMMUNOEMATOLOGIA

4.1. Generalità	Pag. 39
4.2. Campo di applicazione	Pag. 39
4.3. Controllo delle attrezzature e schema di minima proposto	Pag. 39
4.4. Controllo dei reagenti e delle metodiche e schema di minima proposto	Pag. 40
4.5. Registrazioni	Pag. 41
4.6. Non conformità e provvedimenti correttivi	Pag. 41
4.7. Bibliografia	Pag. 42

PAGINA BIANCA

4.1. GENERALITÀ

Si premette che per tutto quanto riguarda la preparazione, l'uso e la garanzia di qualità dei prodotti delle strutture trasfusionali si deve fare riferimento alla Raccomandazione n° R (95) 15 del Comitato dei Ministri del Consiglio d'Europa.

Questa raccomandazione fatta agli Stati membri infatti fornisce linee guida per tutta la materia trasfusionale ed è così articolata:

- parte A : Good Manufacturing Practice (GMP) per gli emocomponenti;
- parte B : Raccolta del sangue;
- parte C : Emocomponenti;
- parte D : Procedure tecniche;
- parte E : Pratica trasfusionale.

Il presente documento, invece, vuole fornire solamente una guida per l'applicazione di un programma "minimo" di Controllo di Qualità Interno (CQI) nelle strutture che sono dotate di un laboratorio di Immunoematologia.

Il Controllo di Qualità Interno in Immunoematologia viene normalmente suddiviso in controllo delle apparecchiature, dei reagenti, delle tecniche; è una suddivisione unicamente teorica perché esistono parziali sovrapposizioni, soprattutto per quanto riguarda reagenti e tecniche.

Lo scopo di un CQI è quello di assicurare una buona ed uniforme sicurezza e soprattutto di minimizzare gli errori. Questi possono essere errori di tipo organizzativo, dovuti ad esempio all'errata identificazione dei campioni, errori di trascrizione o di archiviazione delle risposte, oppure errori di tipo tecnico, per lo più dovuti alla scarsa qualità dei reagenti, delle metodiche adottate, delle strumentazioni in uso.

4.2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il campo di applicazione riguarda tanto le attrezzature quanto i reagenti e le metodiche.

4.3. CONTROLLO DELLE ATTREZZATURE E SCHEMA DI MINIMA PROPOSTO

L'accertamento delle prestazioni delle attrezzature o meglio dell'insieme degli strumenti di un laboratorio di Immunoematologia deve uniformarsi ai principi generali della GMP e rispettare, dove applicato, il Sistema Qualità ISO 9000 ed è d'obbligo in tre specifiche circostanze:

- al momento dell'installazione, che deve essere accompagnata dai dati di validità rilasciati dal fabbricante;
- dopo ogni riparazione od adattamento che possono averne alterato il funzionamento;

- tutte le volte che vi sia un ragionevole dubbio sulla regolare funzionalità dell'apparecchio.

Si deve preparare un programma di controlli regolari e sistematici della funzionalità dell'apparecchio. Gli intervalli di tempo fra i controlli dipendono da due fattori principali: la frequenza d'uso dello strumento e la sua aspettativa di vita nel laboratorio; anche la calibrazione degli apparecchi dovrà seguire un programma concordato.

Le principali attrezzature da prendere in considerazione ed i controlli proposti sono:

- a) termostati, incubatori, bagnomaria: verifica quotidiana della temperatura;
- b) frigoriferi e frigoemoteche: verifica quotidiana della temperatura;
- c) congelatori, centrifughe per sacche: verifica quotidiana della temperatura;
- d) centrifughe per sacche: controllo bimestrale della velocità, dell'accelerazione e della decelerazione;
- e) centrifughe da banco: gli stessi controlli delle centrifughe per sacche, ma annualmente;
- f) bilance miscelatrici per sacche: controllo bimestrale del peso e della miscelazione.

4.4. CONTROLLO DEI REAGENTI E DELLE METODICHE E SCHEMA DI MINIMA PROPOSTO

- a) Controllo quotidiano:
 - controllo degli antisieri anti-A, anti-B, anti-D e delle emazie testo (gruppo diretto e indiretto), mediante utilizzo della metodica routinaria usufruendo di sangue fresco di gruppi già ricontrollati (gruppi eseguiti in urgenza o già in archivio);
 - controllo, se in uso, di schedine in gel o altro materiale e di piastre per gruppi attraverso il ricontrollo di gruppi già noti.
- b) Controllo settimanale:
 - controllo del fenotipo Du con utilizzo di un campione Du positivo del commercio;
 - controllo della ricerca di anticorpi irregolari sierici in Coombs / Liss-Coombs mediante utilizzo di anticorpi della sieroteca o del commercio;
 - controllo del test di Coombs diretto con utilizzo di emazie del commercio sensibilizzate con IgG e C3d.
- c) Controllo dei nuovi lotti. Su ogni nuovo lotto in arrivo controllare:
 - antisieri, schedine o piastre per il fenotipo Rh;
 - antisieri, schedine o piastre per il sistema Kell;
 - antisieri, schedine o piastre per i sottogruppi di A;
 - siero di Coombs, in fase liquida, in schedina o piastra.

4.5. REGISTRAZIONI

Le registrazioni dei risultati dei controlli di qualità interni vanno eseguite su appositi registri o, quando possibile, su supporti informatici.

L'archiviazione di tali registrazioni va mantenuta almeno 1 anno.

La registrazione deve includere anche l'identità della persona o delle persone che hanno effettuato i controlli. In caso di non conformità dovrà essere registrato anche il provvedimento correttivo assunto.

Nel caso sia necessario apportare correzioni al registro, la registrazione originale non deve essere cancellata, ma deve rimanere leggibile.

4.6. NON CONFORMITÀ E PROVVEDIMENTI CORRETTIVI

I risultati non conformi all'atteso, opportunamente registrati, impongono due tipi di procedure:

- analisi del motivo della non conformità: errore nelle procedure manuali, malfunzionamento delle apparecchiature, non adeguatezza dei reagenti, ecc.
- provvedimenti correttivi: sono strettamente correlati al tipo di analisi interessata e normalmente riguardano la sostituzione dei reagenti, la taratura e/o revisione degli strumenti, la correzione e gli adeguati controlli delle manualità o quant'altro coinvolto nelle procedure.

Il provvedimento correttivo va debitamente registrato e successivamente va documentata la sua reale efficacia.

4.7. BIBLIOGRAFIA

- American Association of Blood Banks. Technical Manual. 1990.
- Consiglio d'Europa. Comitato dei Ministri. Raccomandazione n. R (95) 15. Preparazione, uso e garanzia di qualità degli emocomponenti. 1998.
- Lewis SM. – Quality assurance programmes in United Kingdom. Ann. Istituto Superiore di Sanità 1995; 31 (1): 53-9.
- Massaro AL. Controllo di Qualità Interno in Immunoematologia. Convegno Interregionale SIMTI, Genova 1997.

5.

PROGRAMMA “MINIMO” DI MICROBIOLOGIA

5.1. Generalità	Pag. 45
5.2. Campo di applicazione	Pag. 45
5.3. Apparecchiature	Pag. 46
5.4. Valutazione dei materiali d'uso	Pag. 48
5.4.1. Terreni di coltura	Pag. 48
5.4.2. Colorazioni	Pag. 49
5.4.3. Altri reagenti	Pag. 49
5.5. Controllo dei test di sensibilità (antibiogramma)	Pag. 50
5.5.1. Metodi automatizzati	Pag. 50
5.5.2. Metodi manuali	Pag. 50
5.5.2.1. Minima Concentrazione Inibente (MIC)	Pag. 50
5.5.2.2. Agar diffusione (antibiogramma sec. Kyrby e Bauer)	Pag. 51
5.5.3. Test di sensibilità ai chemioantibiotici su miceti	Pag. 56
5.6. Controllo di qualità interno in sieroimmunologia	Pag. 56
5.6.1. Introduzione	Pag. 56
5.6.2. I saggi di sierologia infettivologica	Pag. 57
5.6.3. Il Controllo di Qualità Interno	Pag. 57
5.6.4. Il campione di controllo	Pag. 58
5.6.5. Il procedimento di preparazione del campione di controllo	Pag. 58
5.6.6. Le preparazioni di riferimento e i campioni di controllo del commercio	Pag. 59
5.6.7. La numerosità e la frequenza del campione di controllo	Pag. 60
5.6.8. La presentazione dei risultati	Pag. 60
5.6.9. L'allestimento della carta di controllo	Pag. 60
5.6.10. La definizione delle regole di controllo	Pag. 61
5.6.11. La gestione della violazione delle regole di controllo	Pag. 61
5.6.12. La zona grigia	Pag. 63
5.7. Allegati	Pag. 64
5.8. Bibliografia	Pag. 79

PAGINA BIANCA

5.1. GENERALITÀ

Il concetto di Controllo di Qualità riferito agli esami di laboratorio si è esteso negli ultimi anni da una verifica della sola fase analitica (organizzazione del lavoro ed esecuzione degli esami di laboratorio) ad una valutazione di qualità “globale”, intesa come verifica di tutto il complesso iter diagnostico, dal momento della richiesta (fase pre-analitica) fino all’utilizzo clinico del dato (fase post-analitica).

Anche nella nuova e più ampia prospettiva, restano di fondamentale importanza l’organizzazione del Controllo Interno di Qualità (CQI) e la partecipazione ad iniziative di Controllo interlaboratori (o programma di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ).

Le note che seguono hanno lo scopo di aggiornare le precedenti indicazioni fornite dalla Regione Lombardia nel 1995, e di proporre una traccia di riferimento per l’organizzazione di un CQI “minimo” in Microbiologia e Virologia.

Per una trattazione più completa sono disponibili pubblicazioni specifiche, alle quali si rimanda (vedi bibliografia).

I presupposti e le condizioni indispensabili per la realizzazione di un programma di CQI sono:

- a) la consapevolezza della sua importanza anche da parte di chi deve garantirne la realizzazione in termini di organico, strutture, mezzi e riconoscimento economico;
- b) la volontà di attuarlo, per il notevole carico di lavoro che ne deriva;
- c) la standardizzazione delle procedure, disponibili in un manuale da banco, tali da garantire la sistematicità e la costanza delle varie fasi analitiche;
- d) la definizione di apparecchiature, materiali e procedure soggetti a controllo;
- e) l’identificazione di chi è responsabile del controllo, per consentire chiarezza di riferimenti all’interno del laboratorio e definire la responsabilità delle valutazioni e degli interventi;
- f) l’aggiornamento periodico del personale preposto alle analisi affinché si renda responsabile dei compiti che deve svolgere;
- g) la registrazione di tutte le osservazioni, di tutti i risultati e degli eventuali interventi correttivi messi in atto;
- h) la revisione periodica degli aspetti operativi ed organizzativi alla luce dei risultati del CQI.

5.2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Le note che seguono trattano gli aspetti del CQI minimo delle diverse branche della microbiologia clinica:

- batteriologia;
- micologia;
- parassitologia;
- virologia;

- sierologia infettivologica.

Il campo di applicazione riguarda tanto le apparecchiature quanto i reagenti e le metodiche.

5.3. APPARECCHIATURE

La programmazione del controllo di qualità delle apparecchiature inizia con la loro **catalogazione**, includendo tutte le apparecchiature utilizzate (di proprietà o in uso temporaneo).

A tale scopo è opportuno prevedere la predisposizione e la compilazione di una scheda informativa sulla quale riportare:

- informazioni relative all'apparecchiatura: tipo, modello, numero di serie; numero d'inventario e dislocazione all'interno della struttura; ditta produttrice, ditta fornitrice e ditta responsabile dell'assistenza tecnica; modalità di acquisizione dell'apparecchiatura; date di consegna e collaudo; data e modalità di alienazione;
- l'elenco dell'eventuale materiale di ricambio necessario per il suo utilizzo di routine;
- uno schema di manutenzione ordinaria (si esegue quotidianamente e comprende tutte le operazioni necessarie ad assicurarne un corretto funzionamento), di quella programmata (controllo periodico dell'apparecchiatura per una verifica delle impostazioni di utilizzo e per prevenire eventuali guasti) e degli interventi di manutenzione straordinaria (interventi eseguiti per la riparazione di guasti). Per la predisposizione delle schede possono tornare utili le informazioni su manutenzione, controllo e verifica del funzionamento fornite al momento della consegna dell'apparecchiatura.

In allegato si riporta un esempio di scheda per la registrazione dei dati.

La corretta **manutenzione** delle apparecchiature ne condiziona il regolare funzionamento e quindi l'affidabilità dei risultati analitici. Le modalità operative sono specifiche per ogni apparecchiatura. Possiamo distinguere:

- le apparecchiature dedicate; per queste si rimanda alle indicazioni delle ditte produttrici;
- apparecchiature di uso comune; queste possono essere:
 - dotate di sistemi automatici di lettura/registrazione dei vari parametri e di sistemi di regolazione e/o allarme: sarà sufficiente una verifica periodica di detti sistemi ed una loro taratura secondo le disposizioni della ditta produttrice, cui il laboratorio deve sempre attenersi;
 - sprovviste di sistemi di allarme e/o registrazione: in questi casi i controlli dei parametri verranno effettuati attraverso procedure essenzialmente manuali. In appendice si riporta un elenco dei parametri da sottoporre a controllo per le apparecchiature di uso più comune, insieme ad alcuni esempi di schede di registrazione dei parametri.

Il Controllo di Qualità Interno in Microbiologia

In tutti i casi deve essere tenuta **registrazione** dei controlli effettuati, prodotti dall'apparecchiatura o raccolti manualmente. Per comodità di compilazione, le schede possono essere apposte sull'apparecchiatura, durante l'uso, provvedendo poi alla loro verifica ed archiviazione, da parte del responsabile del controllo di qualità, quando complete. Copia dei risultati deve essere conservata per un anno.

È appena il caso di ricordare che gli strumenti di misura utilizzati (termometri, bilance, ecc.) devono essere controllati, almeno una volta all'anno, utilizzando strumenti di misura di riferimento. Tale servizio può, per semplicità, essere affidato a ditte esterne.

Nella tabella sotto riportata sono fornite indicazioni per il controllo delle apparecchiature non dotate di sistemi automatici di controllo.

Apparecchiature e strumenti di uso comune: parametri e modalità di controllo

Apparecchio	Parametri controllati	Modalità di controllo	Periodicità (minima)	Registrazione
Termostati ad aria	umidità	acqua nella bacinella	quotidiana	
	temperatura (tolleranza $\pm 1^\circ \text{C}$)	termometro a max/min	quotidiana	Sì
Termostati a CO ₂	Umidità	acqua nella bacinella	quotidiana	
	temperatura (tolleranza $\pm 1^\circ \text{C}$)	termometro a max/min	quotidiana	Sì
	percentuale relativa della CO ₂	lettura indicatore	settimanale	Sì
Bagnomaria (termostati ad acqua)	temperatura (tolleranza $\pm 1^\circ \text{C}$)	termometro	quotidiana	Sì
	livello acqua e qualità	ispezione visiva	settimanale	
Frigoriferi e celle frigorifere	temperatura (2-8° C)	termometro a max/min	quotidiana	Sì
	formazione di ghiaccio	ispezione visiva / sbrinamento	settimanale al bisogno	
Congelatori	temperatura (tolleranza $\pm 2^\circ \text{C}$)	termometro a max/min	settimanale	Sì
	formazione di ghiaccio	ispezione visiva sbrinamento	settimanale semestrale	Sì
Autoclavi	effetto sterilizzante 121°c per 10-15'	registrazione grafica: tempo/temperat./press.	ogni ciclo	Sì
		test con spore di <i>B. stearothermophilus</i>	mensile	Sì
pHmetro	misura pH	calibrazione	ad ogni uso	
Lampade UV germicide	emissione uv	verifica emissione uv o sostituzione lampada	trimestrale o 3000 ore d'uso	Sì
Sistemi di anaerobiosi per giare tipo Gas-Pak	atmosfera	indicatori di eh (blu di metilene)	ogni uso	Sì
Centrifughe	corretto funzionamento	verifica generale (da parte delle ditte incaricate)	annuale	Sì
Bilance				
Cappe flusso laminare				
Agitatori				
Microscopi				
Termometri				
Pipette				

5.4. VALUTAZIONE DEI MATERIALI D'USO

La garanzia di qualità dei materiali d'uso, al momento dell'acquisto e dell'arrivo e durante la conservazione in laboratorio, è particolarmente importante in microbiologia per lo scarso grado di automazione e le particolari tipologie analitiche, che rendono non applicabili, se non per i saggi immunometrici, le tecniche utilizzate in altre discipline che prevedono l'inserimento di controllo positivi e negativi in ogni serie analitica. In alcune branche, quali la parassitologia e la micologia, è di fatto l'unico controllo effettuabile.

Per i diversi materiali d'uso nelle indagini microbiologiche (coloranti, reagenti chimici, dischetti, antisieri, kit commerciali, ecc.) occorre garantire:

- a) acquisto presso ditte che diano garanzie di produzione (composizione del materiale, effettuazione dei controlli di qualità) e di consegna;
- b) acquisto o preparazione di quantitativi proporzionati ai consumi e sempre prima dell'esaurimento delle scorte, per poterne verificare la qualità prima dell'uso;
- c) conservazione in idonee condizioni ambientali;
- d) utilizzo di registri o schede o supporti informatici sui quali annotare: la denominazione del prodotto, la ditta fornitrice, la data di arrivo del materiale, il numero di controllo e/o del lotto, la data di scadenza e/o di produzione, la data di apertura della confezione in uso.

5.4.1. TERRENI DI COLTURA

I terreni di coltura sono largamente utilizzati in Microbiologia e sono per lo più acquistati "pronti per l'uso" in piastra o provetta; più raramente sono preparati in laboratorio partendo da prodotti disidratati con l'eventuale aggiunta di supplementi.

A. Terreni acquistati "pronti"

- a) Acquistare i terreni presso ditte che forniscano idonea documentazione sulle procedure usate per l'effettuazione dei controlli di qualità di ogni lotto produttivo. In particolare ogni produttore deve inviare all'utilizzatore la documentazione che includa:
 - l'elenco dei microrganismi utilizzati per il controllo di qualità;
 - la misurazione del pH dei terreni;
 - i risultati delle prove di efficienza e di sterilità.
- b) Acquistare terreni che rechino impresso sul contenitore il nome del terreno e la data di scadenza e/o di produzione.
- c) Rifornirsi di nuovi terreni prima dell'esaurimento delle scorte.
- d) Ispezionare ogni lotto di terreno all'arrivo in laboratorio per rilevare eventuali:
 - anomalie o rotture dei contenitori (piastre di Petri e provette) e/o dell'imballaggio;
 - distribuzione disomogenea del terreno;
 - presenza di crepe nel terreno;

Il Controllo di Qualità Interno in Microbiologia

- numero eccessivo di bolle e buchi;
- segni di emolisi;
- segni di disidratazione;
- segni di contaminazione.

Ogni anomalia riscontrata dovrà essere registrata su apposite schede documentali e comunicata alla ditta fornitrice per l'invio di una nuova fornitura.

e) Sottoporre ad ulteriori controlli di efficienza i seguenti terreni per i quali la letteratura segnala un "elevato rischio" di ridotta performance:

- *Campylobacter* agar, utilizzando *C.jejuni* (ceppo consigliato: ATCC 33291);
- terreni selettivi per Neisserie patogene, utilizzando *N. gonorrhoeae* (ceppo consigliato: ATCC 43069 o ATCC 43070).

B. Terreni preparati in laboratorio

Per i terreni preparati in laboratorio è obbligatorio verificare per ogni lotto:

- il pH;
- la sterilità;
- l'efficienza (crescita e/o inibizione di specifici microrganismi).

Per le modalità di esecuzione, registrazione e per gli eventuali interventi correttivi si rimanda alla letteratura specifica.

5.4.2. COLORAZIONI

Le colorazioni che devono essere sottoposte a controllo sono: la colorazione di Gram e le colorazioni Alcool Acido Resistenti (AAR) per la ricerca di micobatteri, quali Ziehl-Neelsen, Auramina Rodamina.

I controlli vanno eseguiti inserendo almeno un campione positivo nella serie dei vetrini da colorare con la cadenza sotto riportata.

COLORAZIONE	CONTROLLO	CADENZA
GRAM	Batteri Gram Positivi Batteri Gram Negativi	Giornaliera
AAR	Bastoncini Alcool Acido Resistenti non Patogeni (BCG)	Ad ogni seduta

Per tutte le altre colorazioni ed in particolare per quelle in immunofluorescenza sia indiretta (in genere sierologiche: quali FTA abs, fluorescenza per *Legionella*, ecc), sia diretta (ad esempio quelle per *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*, il complesso *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Pneumocystis carinii*), è comunque raccomandabile l'inserimento in ogni serie analitica di un controllo positivo e di un controllo negativo. Tali controlli sono di frequente già compresi nei kit commerciali.

In allegato 1 è riportato un esempio di scheda per la registrazione del Controllo di Qualità della colorazione di Gram.

5.4.3. ALTRI REAGENTI

Come già detto per la peculiarità delle indagini batteriologiche, micologiche, parassitologiche non è possibile effettuare controlli su ciascuna serie analitica. Ne consegue la necessità del rigoroso rispetto delle procedure e del sistematico controllo dei materiali d'uso più "critici". Ciascun laboratorio dovrà predisporre un programma di controllo comprendente:

- elenco dei materiali da controllare;
- periodicità dei controlli (ad ogni nuovo lotto/preparazione e/o cadenza predefinita);
- modalità dei controlli (ceppo o reagente utilizzato e risultati attesi);
- interventi correttivi.

Negli allegati 2 e 3 vengono proposti alcuni materiali da controllare ed un esempio di scheda di rilevazione e registrazione dei risultati.

5.5. CONTROLLO DEI TEST DI SENSIBILITÀ (ANTIBIOGRAMMA)

L'istituzione di un programma di controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici si propone di assicurare l'appropriatezza dei risultati delle prove eseguite sugli stipti batterici isolati da campioni biologici attraverso la valutazione dei risultati su ceppi di controllo a sensibilità nota.

Le prove di controllo di qualità debbono riprodurre le modalità operative espletate abitualmente nell'attività diagnostica, per quanto attiene ai criteri di scelta degli antibiotici, alla metodologia utilizzata ed ai criteri interpretativi.

Dal punto di vista operativo il CQI ha diverse modalità a seconda che si utilizzino metodi automatizzati o metodi manuali.

5.5.1. METODI AUTOMATIZZATI

In commercio sono disponibili sistemi per la valutazione della sensibilità ai chemioantibiotici mediante diluizione in brodo che valutano la Minima Concentrazione Inibente (MIC), in genere su un ridotto numero di diluizioni, basati sul cosiddetto sistema "break-point" che utilizzano due sole concentrazioni, o più raramente una, di chemioantibiotico.

Per questi metodi, allo stato attuale, non esistono indicazioni formali da parte di agenzie o società scientifiche per l'effettuazione e la valutazione del Controllo di Qualità Interno con ceppi di riferimento.

L'affidabilità dei risultati è garantita attraverso il rigoroso rispetto delle indicazioni fornite dalle ditte produttrici sia riguardo ai controlli di qualità da effettuare con l'utilizzo di ceppi a sensibilità nota, sia riguardo all'esecuzione delle prove analitiche.

Si raccomanda di effettuare sempre un controllo di purezza dell'inoculo, seminandone alcuni µl su una piastra di idoneo terreno.

5.5.2. METODI MANUALI

5.2.2.1. MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

La determinazione della (MIC), sia in brodo, sia in agar diluizione, è metodica raramente utilizzata di routine nei laboratori della Regione Lombardia.

Per le modalità di esecuzione dei controlli di qualità si rimanda alle indicazioni fornite da NCCLS.

5.5.2.2. AGAR DIFFUSIONE (ANTIBIOGRAMMA SECONDO KIRBY E BAUER)

Lo scopo primario del controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici (metodo di agar diffusione secondo Kirby e Bauer) è la valutazione dell'accuratezza della procedura.

Viene esclusa dalle indicazioni tecniche relative al controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici la valutazione della precisione, in quanto pragmaticamente ritenuta di scarsa valenza.

La procedura dell'antibiogramma secondo Kirby e Bauer si definisce accurata quando in una serie di 20 test consecutivi non più di 1 test risulta fuori dal range previsto per ciascuna combinazione chemioantibiotico-microorganismo.

A. Stipiti microbici

È necessario utilizzare stipiti microbici ATCC commerciali. Alternativamente è possibile procurarli direttamente da American Type Culture Collection.

a) Stipiti microbici a sensibilità nota ed opportunamente conservati da utilizzare in caso di esecuzione di antibiogrammi di batteri comuni "non esigenti", con la cadenza più oltre specificata:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

b) Stipiti microbici a sensibilità nota ed opportunamente conservati da utilizzare in caso di esecuzione di antibiogrammi su stipiti batterici "esigenti", con la cadenza più oltre specificata:

- *Haemophilus influenzae* ATCC 49247
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
- *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226

c) Stipiti microbici a sensibilità nota da utilizzare per il controllo di qualità delle prove di sensibilità ai chemioantibiotici su oxacillina effettuate con test di screening su Oxacillin-Salt Agar, con la cadenza più oltre specificata:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Nota: tale metodica deve essere preferita ai tradizionali metodi di valutazione in agar diffusione secondo Kirby e Bauer (vedi allegato 13).

Inoltre può essere utile saggiare:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 al fine di verificare il contenuto in timina e timidina dell'agar di Mueller-Hinton quando vengono saggiati sulfamidici e

sulfametossazolo/trimethoprim oppure quando vengano testati aminoglicosidi ad alto dosaggio.

- *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 per verificare l'attività di specifiche molecole beta-lattamiche.

È evidente che ogni laboratorio sceglierà il numero ed il tipo di stipiti da saggiare in base alla propria attività; ad esempio un laboratorio che esegue solo antibiogrammi su batteri non esigenti, che utilizza agar di Mueller-Hinton commerciale già pronto in piastra e certificato per il contenuto in timina e timidina, si limiterà ad utilizzare *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

B. Utilizzo e conservazione degli stipiti di controllo

- a) Testare la qualità dei ceppi di controllo con il metodo standard di diffusione con dischetto, utilizzando gli stessi agenti antimicrobici (o quelli rappresentativi) impiegati per testare i ceppi isolati da campioni clinici.
- b) Conservare i ceppi di controllo su agar triptosio (i ceppi non “esigenti”) o su agar cioccolato arricchito (i ceppi “esigenti”), a “becco di clarino” a 4-8° C e sottocolturarli settimanalmente. I ceppi possono essere conservati, se si dispone delle attrezzature, a -20° C o a temperature inferiori in provette con un appropriato stabilizzatore (es. in brodo con siero fetale di vitello al 50%, glicerolo al 10-15% in brodo triptosio, sangue defibrinato di montone o latte scremato) o in stato “freeze-dried” senza un rischio significativo di alterare la loro sensibilità agli antibiotici.
- c) Allestire un numero di colture a becco di clarino tale da soddisfare le esigenze settimanali, tenendo conto che per ogni test di sensibilità si deve utilizzare una diversa coltura.
- d) Utilizzare l'ultima coltura per ricostituire la serie e rinnovare così i ceppi con frequenza settimanale.
- e) Sostituire questi ceppi almeno mensilmente con quelli contenuti nel congelatore, nel “freeze-dryer” o con colture commerciali.
- f) Sottocolturare dal becco di clarino su piastre di agar i ceppi, prima che siano testati, per ottenere delle colonie isolate.
- g) Fare crescere o sospendere le colonie da testare concordemente alle procedure per la preparazione dell'inoculo.
- h) Utilizzare una coltura per il controllo di qualità per monitorare l'accuratezza del test di diffusione con dischetto, finché non ci siano significativi cambiamenti nel diametro medio dell'alone d'inibizione che non possano essere attribuiti ad errori operativi. Se un risultato inspiegato suggerisce un cambiamento significativo inerente la sensibilità del microrganismo, deve essere ottenuta una coltura fresca del ceppo di controllo a partire cioè dalla confezione commerciale originale o dai ceppi congelati, quindi riprendere la procedura come descritto al punto c).

C. Frequenza delle prove

- a) Gli stipiti microbici *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, vanno utilizzati come controlli degli antibiogrammi di batteri “non

esigenti”; la frequenza di esecuzione delle prove di controllo di qualità deriva dalla performance osservata per i risultati di ogni coppia chemioantibiotico-microorganismo, come di seguito indicato.

Inizialmente l'intera performance del sistema di valutazione deve essere monitorata attraverso la valutazione di appropriati ceppi di controllo ogni giorno in cui il test venga eseguito. In seguito, la frequenza di monitoraggio del test può essere ridotta se il laboratorio può documentare di aver raggiunto una performance soddisfacente con i test di controllo quotidiani. A tale scopo, una performance soddisfacente è definita dalla presenza di documenti che confermino come:

- tutti i ceppi di controllo siano stati testati per 30 test giornalieri consecutivi;
- non più di 3 dei 30 diametri degli aloni d'inibizione, per ogni combinazione farmaco-microorganismo, siano oltre i limiti di controllo dell'accuratezza stabiliti nell'allegato 4.

Nota: Questa procedura vale solo per stabilire la performance soddisfacente dei test di diffusione con dischetto allo scopo di eseguire i test di controllo di qualità a cadenza settimanale piuttosto che quotidiana. Non confondere questa procedura con i passaggi necessari per intraprendere un'azione correttiva specificati nel paragrafo “Azioni Correttive”.

Quando i precedenti criteri siano soddisfatti, ogni singolo ceppo di controllo può essere testato settimanalmente. Inoltre il ceppo deve essere testato, al di là di tale frequenza, ogni volta che vengano introdotti: un nuovo lotto di agar, un nuovo lotto di dischetti con sostanze antimicrobiche, nuovi reagenti o quando più di 1 diametro degli aloni d'inibizione sia oltre i limiti accettabili di controllo. (vedere paragrafo successivo).

- b) Gli stipiti *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226 vanno utilizzati ogni volta che venga introdotto un nuovo lotto di terreno o di dischetti. I range degli aloni di inibizione sono riportati negli allegati 5, 6, 7. Il controllo deve essere effettuato prima della messa in uso dei nuovi lotti. Qualora i limiti di controllo di alcuni chemioantibiotici saggiati non fossero rispettati, i nuovi reagenti non potranno essere messi in uso; si rende necessaria una ripetizione del test. In caso di ulteriori “non conformità” bisogna sostituire il reagente non idoneo (terreno o dischetti). Fintanto che non si è risolto il problema si deve sospendere la refertazione degli esiti degli stipiti di isolamento clinico per la/e combinazione/i del farmaco/microorganismo fuori controllo. In alternativa è possibile saggiare estemporaneamente gli stipiti di controllo ogni volta che vengano eseguiti antibiogrammi per tali microrganismi.
- c) Gli stipiti di *S. aureus* ATCC 29213 (stipite sensibile) e di *S. aureus* ATCC 43300 (stipite resistente) devono essere utilizzati per il controllo di qualità delle prove di sensibilità ai chemioantibiotici su oxacillina effettuate con test di screening su Oxacillin Salt Agar. La frequenza delle prove può essere settimanale dopo un periodo di validazione di 30 giorni, come indicato al punto a). In alternativa è

possibile saggiare estemporaneamente gli stipiti di controllo ogni volta che si esegue il test su Oxacillin Salt Agar.

D. Lettura degli aloni d'inibizione

Nell'allegato 4 sono indicati i diametri degli aloni d'inibizione (minimo e massimo) che dovrebbero essere osservati in ogni singolo test di controllo.

In generale, quando si utilizza un sistema di monitoraggio della qualità con frequenza settimanale, solo 1 test in una serie di 20 consecutivi può risultare oltre i limiti di controllo (all'esterno dei limiti di controllo stabiliti per l'accuratezza). Se più di un risultato appare oltre questi limiti, è necessario apportare un'azione correttiva.

Nota: Non confondere questa procedura con quella per stabilire una performance soddisfacente dei test di diffusione con dischetto, allo scopo di valutare la qualità dei test di controllo a cadenza settimanale piuttosto che quotidiana (vedere paragrafo precedente).

E. Comuni fonti di errore

Quando il diametro di un alone d'inibizione è oltre i limiti di controllo accettabili, stabiliti nell'allegato 4, devono essere considerate le seguenti comuni fonti di errore:

- errore nella trascrizione dei dati di controllo;
- errore di lettura nella misura dei diametri degli aloni d'inibizione;
- contaminazione o altri cambiamenti nel ceppo di controllo;
- sospensione dell'inoculo troppo pesante o troppo leggera;
- mancata agitazione al vortex dello standard di torbidità 0,5 McFarland di solfato di bario o deterioramento dello standard;
- errata incubazione per atmosfera e/o temperatura;
- variabilità della performance del terreno usato per il test;
- perdita di potenza del dischetto durante la manipolazione o la conservazione in laboratorio.

Quando si osservi per la prima volta un risultato oltre i limiti di controllo accettabili è possibile risolvere facilmente i primi tre tipi di errore attraverso un attento riesame delle piastre. In tutti gli altri casi vanno intraprese le azioni correttive indicate al paragrafo successivo.

F. Azioni correttive

La prima azione da intraprendere è la sospensione della refertazione degli esiti della seduta analitica effettuata su stipiti di isolamento clinico (limitatamente all'associazione chemioantibiotico-microrganismo per la quale si è rilevato l'errore).

Se i risultati fuori controllo sono dovuti ad un errore di facile interpretazione (ad es. l'uso di un dischetto sbagliato, di un ceppo di controllo sbagliato, la contaminazione di un ceppo o una scorretta atmosfera d'incubazione) è sufficiente ripetere il test di controllo di qualità.

Se la ripetizione del test dà un risultato corretto non si rendono necessarie altre prove supplementari ed è possibile procedere alla refertazione dei risultati ottenuti sui campioni clinici nella seduta precedente.

Se non si individua nessun errore di tale tipo, responsabile dei risultati fuori controllo, il laboratorio deve ritornare ad eseguire giornalmente i test fino alla precisazione della causa dei risultati aberranti ed alla risoluzione del problema, che deve essere documentata.

Essa può essere documentata attraverso le seguenti azioni:

- la valutazione con appropriati ceppi di controllo per 5 giorni consecutivi;
- la documentazione che, per ogni combinazione farmaco-microrganismo, tutti i 5 diametri degli aloni d'inibizione (cioè i diametri degli aloni d'inibizione ottenuti da una combinazione farmaco-microrganismo per 5 giorni consecutivi) siano entro i range accettabili, come indicato nell'allegato 4.

Se il problema si risolve in 5 giorni si ritorna alla frequenza settimanale. Se invece non è stato risolto in tale periodo è necessario continuare i test di controllo quotidianamente fino al raggiungimento della risoluzione del problema. Il ritorno ad una cadenza di valutazione settimanale dei test di controllo richiederà, come per il periodo iniziale, la documentazione di una performance soddisfacente per altri 30 giorni di test consecutivi.

Fintanto che non si sia giunti a risoluzione del problema dei risultati "fuori controllo", il laboratorio deve sospendere la refertazione degli esiti della sensibilità degli stipiti di isolamento clinico (sempre limitatamente all'associazione chemioantibiotico-microrganismo per la quale si è rilevato l'errore).

G. Modalità di compilazione delle schede di raccolta dati

Nelle schede di raccolta dati devono essere registrati la data di esecuzione del controllo ed i risultati delle letture per ogni combinazione farmaco-microrganismo. Per una più facile interpretazione dell'andamento del controllo di qualità ed una valutazione più immediata degli eventuali risultati aberranti, è preferibile che le schede possano raccogliere i dati di 20-30 letture consecutive ed ivi siano riportati i range stabiliti per l'accuratezza. Dai risultati, infatti, dipendono la frequenza di esecuzione del controllo di qualità e la necessità di un'azione correttiva.

Come già detto la frequenza di esecuzione del controllo di qualità può essere ridotta da giornaliera a settimanale se si raggiunge una performance soddisfacente, cioè se, in una serie di 30 test consecutivi, non più di 3 diametri degli aloni d'inibizione siano oltre i limiti di controllo dell'accuratezza.

Nell'eseguire settimanalmente il controllo di qualità, considerando 20 letture consecutive, l'osservazione di più di 1 diametro di un alone d'inibizione per ogni combinazione farmaco-microrganismo oltre i limiti di controllo dell'accuratezza impone il riesame dell'intero processo, per l'individuazione della causa e della sua possibile risoluzione. Quest'ultima potrà essere documentata testando il controllo di qualità quotidianamente per 5 giorni consecutivi. Se tutti gli aloni di inibizione rientreranno entro i range stabiliti sarà possibile riprendere la valutazione con cadenza settimanale. Si riprenderà, quindi, il conteggio delle 20 determinazioni settimanali consecutive. In caso contrario sarà necessario proseguire con i test

quotidiani per un periodo di 30 giorni consecutivi, rifacendosi al criterio per la definizione della performance soddisfacente.

Nelle schede proposte (vedi allegato 8) è stato introdotto un apposito spazio in cui riportare i dati riguardanti la data, il nome dell'operatore, le letture dei diametri e le eventuali note relative ad esse. Poiché vengono prese in considerazione 20 letture consecutive, si è ritenuto opportuno indicare le date di inizio e fine della compilazione della scheda.

Negli allegati 9, 10, 11, 12 e 13 sono sinteticamente riportate le metodiche per l'utilizzo dei dischetti dei chemioantibiotici, l'esecuzione e la lettura degli antibiogrammi in agar diffusione, le modificazioni a tale metodica per gli stipiti "esigenti" ed il test per la valutazione della resistenza all'oxacillina.

5.5.3. TEST DI SENSIBILITÀ AI CHEMIOANTIBIOTICI SU MICETI

Considerate le problematiche tecniche relative all'esecuzione dei test di sensibilità ai chemioantibiotici su miceti (lieviti e miceti filamentosi), determinate dalla tipologia dei microrganismi e delle molecole antifungine, e relative alle condizioni sperimentali (componenti del medium di coltura, del pH del terreno, dell'inoculo fungino, delle condizioni di incubazione) e considerata, inoltre, l'assenza di standard interpretativi internazionali, **l'antimicogramma non deve essere effettuato**. In condizioni routinarie, le richieste cliniche al proposito debbono essere scoraggiate. L'applicazione della metodica di agar diffusione secondo Kirby e Bauer non è da considerarsi metodica praticabile.

5.6. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO IN SIEROIMMUNOLOGIA

5.6.1. INTRODUZIONE

I test immunometrici per la diagnosi, controllo e prevenzione delle infezioni virali, hanno raggiunto una vasta diffusione nei laboratori di analisi cliniche, cui accedono in forma di confezione diagnostica di reattivi comprensiva di protocollo operativo, il "kit".

Sussistono tuttavia ancora difficoltà nella standardizzazione di questi saggi a causa del grande numero e del continuo ricambio di tecniche e di reattivi e per l'esigua disponibilità di materiali e metodi di riferimento. Tenuto conto della rilevanza diagnostica di questi saggi che sono impiegati anche per la prevenzione delle infezioni virali trasmissibili con il sangue, il controllo e la necessità di uniformare il dato analitico sono, anche per questi saggi di sierologia infettivologica, delle esigenze irrinunciabili.

Il processo valutativo globale e potenziale diagnostico di un reattivo immunometrico dovrebbe prevedere, prima della sua introduzione in routine, una valutazione preliminare da parte del laboratorio, al fine di verificare precisione, accuratezza, sensibilità e specificità.

Questo aspetto del controllo del reattivo diagnostico resta tuttavia largamente inattuato perché i costi ed il lavoro richiesto sono incompatibili per la maggior parte dei laboratori.

È quindi consuetudine dei laboratori acquisire queste informazioni da parte della ditta produttrice o da laboratori che hanno una maggiore esperienza e dalla letteratura scientifica.

Nella presente difficoltà di poter eseguire una approfondita valutazione preliminare del tipo saggio che si andrà ad introdurre nella routine, acquista pertanto particolare importanza l'applicazione di uno stringente programma di Controllo di Qualità Interno (CQI).

5.6.2. I SAGGI DI SIEROLOGIA INFETTIVOLOGICA

I saggi per la ricerca di antigeni e/o anticorpi applicati alla diagnostica infettivologica sono largamente diffusi presso i Servizi di Medicina di Laboratorio e, relativamente ai saggi per la rilevazione di HBsAg, anti-HCV e anti-HIV e la sierologia della lue, anche nei Servizi di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale.

Nel corso degli anni le prestazioni di questi saggi sono notevolmente migliorate sia in termini di sensibilità, con conseguente riduzione della cosiddetta "fase finestra", sia in termini di specificità, con una notevole riduzione del numero di risultati falsamente positivi e, nello stesso tempo, per un netto miglioramento delle prestazioni dei laboratori.

Data la rilevanza diagnostica di questi esami, è previsto che i reattivi per l'esecuzione dei saggi per HBsAg e anti-HCV siano sottoposti alla registrazione (D.M. 12/12/1991) e per i saggi per la ricerca di anti-HIV anche al controllo lotto per lotto (D.M. 3/3/1987), prima della loro commercializzazione.

Inoltre la direttiva europea 98/79/CE sui dispositivi medici per la diagnostica in vitro prevede che per questi dispositivi/reagenti siano applicati i moduli di conformità più severi allo scopo di garantire, attraverso la qualità dei prodotti, la protezione della salute dei pazienti e l'affidabilità dei risultati, interesse primario dell'utente.

Rispetto alle analisi di chimica clinica, il settore di laboratorio della sierologia infettivologica solo recentemente ha affrontato la problematica relativa al CQI, questo principalmente perché si tratta in genere di saggi di tipo qualitativo a risposta "si" o "no", "positivo" o "negativo" (o più propriamente "reattivo" o "non reattivo") e per il fatto che solo per alcuni analiti sono disponibili delle preparazioni internazionali di riferimento.

Con il presente documento si intende proporre un programma "minimo" di CQI relativamente ai saggi per la ricerca di: anticorpi anti-HIV, anti-HCV, anti-Toxoplasma, anti-Rosolia e anti-Cytomegalovirus, ai saggi per la ricerca dell'antigene di superficie dell'HBV (HBsAg) e per la sierologia della Lue (VDRL, RPR e TPHA, TPPA).

5.6.3. IL CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Scopo del controllo di qualità nel laboratorio è quello di segnalare le anomalie rispetto ad una situazione accettata e assunta come riferimento.

Il laboratorio deve perciò attivare al suo interno delle procedure per assicurare che il sistema analitico dia risultati accettabili e riproducibili. Queste operazioni di controllo della qualità analitica che ciascun laboratorio attua si basano sull'uso di uno o più campioni di controllo. I risultati dei controlli devono essere disponibili in tempo reale per permettere un giudizio, su base statistica, circa l'accettabilità o meno dei risultati ottenuti nella serie analitica. Nella gestione del CQI si ribadisce che non possono essere considerati campioni di Controllo di Qualità Interno i calibratori, i controlli negativi (CN) e i controlli positivi (CP) del reattivo diagnostico, ma per campione di Controllo di Qualità Interno si deve intendere un siero esterno al sistema analitico.

5.6.4. IL CAMPIONE DI CONTROLLO

Il materiale di controllo deve essere omogeneo e stabile e soddisfare le esigenze di commutabilità, cioè presentare le stesse caratteristiche chimico fisiche dei campioni dei pazienti.

Per i saggi immunometrici di sierologia infettivologica, come campione di CQI è consigliabile l'utilizzo, almeno, di un campione positivo a debole reattività. Questo campione può essere acquisito dal commercio o può essere preparato direttamente dal laboratorio.

I campioni del commercio presentano minori rischi biologici, non necessitando di particolari manipolazioni per la loro preparazione; altro vantaggio, per alcuni di essi, è la presenza di un certificato di "garanzia"; possono tuttavia presentare lo svantaggio di non essere "tarati" sul sistema analitico in uso nel laboratorio.

I campioni preparati in laboratorio hanno il vantaggio, oltre al basso costo, di essere "tarati" sul sistema analitico in uso nel laboratorio; possono tuttavia presentare un potenziale rischio biologico dovuto alla loro manipolazione durante le fasi di preparazione.

5.6.5. IL PROCEDIMENTO DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI CONTROLLO

Per il CQI dei test di sierologia infettivologica è opportuno disporre di un campione a debole reattività (valore di 3-4 volte il valore del rapporto tra il segnale analitico e il valore di cut-off)

Il laboratorio può preparare direttamente il campione di controllo per diluizione di un campione positivo in una matrice di siero o plasma umano negativo per il sistema Ag/Ab di cui si vuol preparare il controllo. È possibile utilizzare come matrice anche siero fetale bovino; è sconsigliabile invece l'utilizzo di altri diluenti (come ad esempio soluzione fisiologica, tamponi presenti nelle confezioni, ecc.), che comportano una significativa alterazione nella concentrazione proteica del campione, differenziando in modo significativo il campione di controllo rispetto al campione biologico.

Utilizzando una matrice di plasma, la modalità di preparazione prevede preliminarmente:

- l'aggiunta di trombina (per 16-18 ore a 4°C);
- la separazione del coagulo e la centrifugazione.

Successivamente, anche per la matrice di siero, è consigliabile:

- la filtrazione con membrane a porosità decrescente (8 µm, 0,45 µm, 0,22 µm);
- l'aggiunta di conservante e antibatterico (sodio mertiolato alla concentrazione di 0,01 g/100 mL).

Se si utilizza come matrice un pool di sieri, è opportuno non utilizzare campioni emolizzati e/o fortemente lipemici.

Tutti i campioni di siero o di plasma (sia sotto forma singola, sia di mini-pool), raccolti per essere utilizzati come matrice negativa, devono essere negativi per la ricerca di HBsAg, anti-HCV e anti-HIV. Per la preparazione di un siero di controllo per la ricerca di HBsAg, la matrice deve essere negativa anche per tutti gli altri marcatori dell'epatite B.

Utilizzando la matrice negativa così preparata, viene effettuata una prova di diluizione con un campione positivo, con punti di diluizioni (di solito al raddoppio) fino ad ottenere un valore del rapporto segnale analitico/cut-off < di 1.

Individuate le diluizioni (3-4 punti) di lavoro, è necessario "tarare" il campione sul metodo/kit in uso nel laboratorio.

Si ripete la prova di diluizione utilizzando dei punti più ravvicinati e si individua quella diluizione che corrisponde a circa 3-4 volte il valore del rapporto S/CO.

Si prepara poi una quantità di campione sufficiente da utilizzare, come campione di Controllo di Qualità Interno, per almeno un anno.

Il campione va ripartito in aliquote (o monouso o sufficienti per una settimana di lavoro) e conservate a -20° C o meno.

5.6.6. LE PREPARAZIONI DI RIFERIMENTO E I CAMPIONI DI CONTROLLO DEL COMMERCIO

Per i marcatori delle epatiti virali A e B e per alcuni analiti del complesso TORCH sono disponibili le preparazioni internazionali di riferimento.

Utilizzando questi standard primari, il laboratorio può così "assegnare" un valore (in Unità Internazionali, in peso) al proprio campione di controllo.

Queste preparazioni possono essere richieste direttamente agli organismi internazionali; in particolare:

- Paul-Ehrlich-Institut, Federal Agency for Sera and Vaccines, Paul-Ehrlich Strasse 51-59, D-63225 Langen, Germany.
- National Institute for Biological Standards and Control, WHO International Laboratory for Biological Standards, P.O. BOX 1193, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QH, England.
- Centre National de Trasfusion Sanguigne, Etablissement Cabanel, 6 rue Alexandre-Cabanel, 75739 Paris Cedex 15, France.

- Scripps Laboratories, San Diego, CA, USA.

Da alcuni anni sono disponibili anche dei materiali del commercio per l'utilizzo come campione di controllo in sierologia infettivologica.

5.6.7. LA NUMEROSITÀ E LA FREQUENZA DEL CAMPIONE DI CONTROLLO

Si ritiene indispensabile l'utilizzo di almeno un campione di controllo debolmente positivo da utilizzare in ogni seduta analitica.

Il campione di controllo deve essere processato con le stesse procedure dei campioni dei pazienti.

I laboratori con un elevato carico di lavoro è opportuno che programmino l'inserimento del campione di controllo ogni 150 campioni in accertamento.

Nella seduta analitica, il campione di controllo dovrebbe essere posizionato e processato preferibilmente all'inizio o dopo aver processato un numero limitato di campioni di pazienti, in modo da poter validare tempestivamente i risultati. Nella situazione di utilizzo di saggi in micropiastra, per i quali la validazione può essere effettuata solo al termine dei saggi stessi e l'eventuale ripetizione del campione di controllo (vedi paragrafo 5.6.11.) sarebbe difficilmente eseguibile nella medesima giornata dati i tempi di esecuzione in genere lunghi, è opportuno prevedere, ai fini della validazione della seduta analitica, l'inserimento in duplicato del campione di controllo. È consigliabile porre un campione verso l'inizio della serie e l'altro verso la fine.

Saltuariamente è possibile prevedere l'inserimento del campione di controllo in altra posizione della serie analitica per poter verificare le diverse condizioni di funzionalità del sistema.

5.6.8. LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei saggi per la sierologia infettivologica sono principalmente di tipo qualitativo (risposta SI/NO, Positivo/Negativo) in riferimento ad un valore soglia (cut-off).

Per poter sorvegliare e monitorare la precisione e, entro certi limiti, anche l'accuratezza è opportuno utilizzare l'espressione numerica del risultato come rapporto tra il segnale analitico e il valore soglia; ad esempio: assorbanza/cut-off (A/CO), segnale/cut-off (S/CO), segnale/negativo (S/N) o, per i test disponibili, in unità di misura ad esempio: Unità Internazionali (per Toxoplasma e Rosolia), ng/mL (per HBsAg), mU/mL (per anti-HBs), diluizione (per Lue).

5.6.9. L'ALLESTIMENTO DELLA CARTA DI CONTROLLO

Tutti i risultati del CQI devono essere registrati ed elaborati sotto forma di carte di controllo.

Nell'allestimento della carta di controllo è consigliabile un approccio che preveda:

- la fase preliminare, che comporta la definizione della media (m) e della deviazione standard (ds) su almeno 20 risultati del campione di controllo. Prima

di accettare come validi i valori della media e della deviazione standard è opportuno verificare che il coefficiente di variazione (CV) che ne deriva ($CV = ds/m \times 100$) non superi il valore del 15-20%. I valori del controllo che determinano un CV superiore al 15-20% vanno scartati e si devono generare nuovi valori del campione di controllo fino al raggiungimento di 20 risultati utili;

- la fase “definitiva”, che utilizza la carta sopra generata e l'applicazione delle regole di controllo prestabilite dal laboratorio.

Per i saggi in diluizione dopo un periodo preliminare di almeno 20 saggi, in base alla frequenza dei risultati ottenuti viene stabilito il valore “atteso” del siero di controllo (ad esempio su 20 risultati: 11 risultati = $1/320$, valore “atteso” = $1/320$)

In allegato 14 sono riportati alcuni esempi di carte di controllo.

5.6.10. LA DEFINIZIONE DELLE REGOLE DI CONTROLLO

È necessario che il laboratorio definisca le regole di allarme e di rifiuto della serie analitica in base al valore del campione di controllo.

Per i saggi immunometrici di sierologia infettivologica, le regole di controllo minime da adottare possono essere:

- regola di allarme: = 1 osservazione al di sotto del limite di - 2ds
- regola di rifiuto: = 1 osservazione al di sotto del limite di - 3ds

Se le osservazioni del controllo sono sopra i valori di + 2ds o + 3ds, la valutazione risulta essere meno stringente (come indicato al punto successivo).

Per i saggi i cui risultati sono espressi in diluizione le regole di controllo minime da adottare possono essere:

- regola di allarme: = 1 osservazione oltre ± 2 diluizioni
- regola di rifiuto: = 1 osservazione oltre ± 3 diluizioni

5.6.11. LA GESTIONE DELLA VIOLAZIONE DELLE REGOLE DI CONTROLLO

Rappresenta l'aspetto di maggior impegno professionale e di maggior conoscenza degli aspetti metodologici del metodo/kit e del significato clinico dei risultati.

In teoria, il verificarsi di una situazione di allarme o di rifiuto dovrebbe portare al rigetto di tutti i risultati generati nella seduta analitica.

In pratica tuttavia ciò non è quasi mai possibile.

Indicativamente:

- se il fuori controllo è limitato ad un solo valore al di sotto della linea di - 2ds (o di oltre ± 2 diluizioni per i saggi in diluizione) e la distribuzione della popolazione esaminata è sostanzialmente regolare (valori dei campioni negativi ben compatti, valori dei campioni positivi sicuramente reattivi), si blocca la serie analitica e si ripete il campione di controllo. Se l'azione ha riportato il campione di controllo entro la regola, si può decidere di ignorare “temporaneamente” il segnale di fuori controllo e validare la serie;
- nel caso di persistenza del valore del campione di controllo al di sotto della linea di - 2ds (o di oltre ± 2 diluizioni per i saggi in diluizione), si blocca la serie

analitica e si ripete il campione di controllo utilizzando una nuova aliquota. Se l'azione ha riportato il campione di controllo entro la regola, si può decidere di ignorare "temporaneamente" il segnale di fuori controllo e validare la serie, in caso contrario applicare le misure indicate al punto successivo;

- nel caso di 3 valori consecutivi del controllo, ottenuti in differenti sedute analitiche, al di sotto della linea di - 2ds (o di oltre ± 2 diluizioni) è opportuno procedere ad un intervento di verifica della strumentazione e/o dei reagenti e/o del procedimento operativo;
- se il "fuori controllo" è al di sotto della linea di - 3ds (o di oltre ± 3 diluizioni per i saggi in diluizione), si deve rigettare la serie analitica e ripetere tutta la seduta analitica (campione di controllo e campioni dei pazienti).

Per i saggi in cui si sia utilizzato il campione di controllo in duplicato, ad esempio saggi in micropiastra (vedi paragrafo 5.6.7.), si suggeriscono le seguenti regole:

- nel caso in cui entrambi i valori dei campioni di controllo risultino al di sotto della linea di - 2ds o al di sotto della linea di - 3ds, si deve rigettare la serie analitica e ripetere la seduta (campioni di controllo e campioni dei pazienti);
- nel caso in cui solo uno dei due valori del campione di controllo risulti al di sotto della linea di - 2ds o di - 3ds e la distribuzione dei risultati dei campioni dei pazienti risulti sostanzialmente regolare, si può decidere di accettare la serie;
- se la situazione descritta al punto precedente si ripete per almeno tre volte su una serie di cinque saggi consecutivi, è necessario procedere ad una verifica della strumentazione (campionatore, sistema di incubazione, sistema di lavaggio, sistema di lettura).

Tutti i dati di "fuori controllo" (non conformità) devono essere registrati, riportando:

- la data dell'avvenuta non conformità;
- il numero di lotto e la data di scadenza del reagente diagnostico;
- il valore trovato;
- la regola violata;
- l'intervento correttivo messo in opera;
- il risultato dell'intervento correttivo;
- la firma di chi ha registrato la non conformità e la successiva validazione.

Per quanto si riferisce ai valori del campione di controllo al di sopra del limite di + 2ds e di + 3ds, è comunque necessario che il laboratorio esamini con attenzione, prima di validare la serie, i valori del calibratore e/o dei controlli negativi e positivi interni del kit e la distribuzione dei valori dei campioni negativi e positivi dei pazienti rispetto, ad esempio, alle sedute precedenti. Se si evidenzia uno spostamento significativo della popolazione dei risultati negativi verso il valore soglia (cut-off) è consigliabile ripetere i campioni che si sono eventualmente posizionati nella zona grigia (vedi punto successivo), o che sono risultati debolmente reattivi.

5.6.12. LA ZONA GRIGIA

È possibile individuare una “zona grigia” o “zona di incertezza” intorno al valore soglia. La sua ampiezza è correlata all'imprecisione del metodo. Maggiore è la dispersione dei valori del campione di controllo, maggiore deve essere la “zona grigia” per quel metodo.

Indicativamente la “zona grigia” può essere espressa come un intervallo corrispondente a $\pm 2CV\%$, trasladando la dispersione dei valori del campione di controllo sul valore soglia.

Per i saggi immunometrici di sierologia infettivologica, un coefficiente di variazione accettabile del campione di controllo debolmente reattivo (valore di 3-4 volte il valore del rapporto tra il segnale analitico e il valore di cut-off) non deve superare il 15-20%.

5.7. ALLEGATI

1. Esempio di scheda di registrazione del controllo di qualità della colorazione di Gram	Pag. 65
2. Esempio di valutazione di alcuni materiali d'uso	Pag. 66
3. Esempio di scheda per la raccolta dati del controllo di qualità interno di alcuni materiali d'uso	Pag. 67
4. Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test su Mueller-Hinton agar senza sangue né altri supplementi	Pag. 68
5. Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test per <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Pag. 70
6. Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test per <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pag. 71
7. Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test per <i>Haemophilus influenzae</i>	Pag. 72
8. Esempio di carta di controllo per la rilevazione dell'accuratezza dei test di sensibilità ai chemioantibiotici	Pag. 73
9. Utilizzo dei dischetti di chemioantibiotici	Pag. 74
10. Esecuzione del test di agar diffusione secondo Kirby e Bauer	Pag. 75
11. Lettura dei risultati del test di agar diffusione secondo Kirby e Bauer	Pag. 76
12. Condizioni per l'esecuzione dei test con metodica di agar diffusione per i microrganismi "esigenti"	Pag. 76
13. Test di screening per la rilevazione della resistenza all'oxacillina di <i>S. aureus</i> su Oxacillin-Salt Agar	Pag. 77
14. Esempi di carte di controllo per sieroimmunologia	Pag. 78

Allegato 2

Esempio di valutazione di alcuni materiali d'uso

Prova effettuabile	Periodicità	Microrganismi consigliati (ATCC n.)
Coagulasi	ogni lotto e dopo intervalli prefissati	<i>S. aureus</i> (25923)
Catalasi	ogni lotto e dopo intervalli prefissati	<i>S. aureus</i> (25923)
Ossidasi	ogni lotto e dopo intervalli prefissati	<i>P. aeruginosa</i> (27853)
Disco di Bacitracina	ogni lotto e dopo intervalli prefissati	<i>S. pyogenes</i> (19615)
Disco di Optochina	ogni lotto e dopo intervalli prefissati	<i>S. pneumoniae</i> (49619)
Fattori V, X, VX	ogni lotto e dopo intervalli prefissati	<i>H. influenzae</i> (49247)
Siero per germinazione	ogni lotto o nuova preparazione	<i>C. albicans</i> (10231)
Antisieri o lattici	ogni lotto	secondo la specificità
Ureasi	ogni lotto o nuova preparazione	<i>P. mirabilis</i> (12453)
Indolo	ogni lotto o nuova preparazione	<i>E. coli</i> (25922)
Microaerofilia	ogni lotto	<i>C. jejuni</i> (33291)

N.B: I ceppi di riferimento indicati sono quelli consigliati; nelle singole realtà se ne possono utilizzare altri aventi le medesime caratteristiche.

Il Controllo di Qualità Interno in Microbiologia

Allegato 3

Esempio di scheda per la raccolta dati del controllo di qualità interno di alcuni materiali d'uso

COAGULASI

Microrganismo: S. aureus (ATCC 25923)

Ditta produttrice e fornitore: _____

Denominazione commerciale del prodotto: _____

N° di Lotto	Data scadenza	Data della preparazione in uso	Data della prova	Risposta attesa	Risultato	Operatore	Note
				Coagulazione			
				Coagulazione			
				Coagulazione			
				Coagulazione			
				Coagulazione			
				Coagulazione			
				Coagulazione			
				Coagulazione			
				Coagulazione			

Allegato 4 (parte prima)

Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test su Mueller-Hinton agar senza sangue né altri supplementi

Agenti antimicrobici	Contenuto del dischetto	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Amikacina	30 µg	19-26	20-26	18-26
Amoxicillina/Acido clavulanico	20/10 µg	19-25	28-36	-
Ampicillina	10 µg	16-22	27-35	-
Ampicillina/Sulbactam	10/10 µg	20-24	29-37	-
Azitromicina	15 µg	-	21-26	-
Azlocillina	75 µg	-	-	24-30
Aztreonam	30 µg	28-36	-	23-29
Carbenicillina	100 µg	23-29	-	18-24
Cefaclor	30 µg	23-27	27-31	-
Cefamandolo	30 µg	26-32	26-34	-
Cefazolina	30 µg	23-29	29-35	-
Cefdinir	5 µg	24-28	25-32	-
Cefepime	30 µg	29-35	23-29	24-30
Cefetamet	10 µg	24-29	-	-
Cefixime	5 µg	23-27	-	-
Cefmetazolo	30 µg	26-32	25-34	-
Cefonicid	30 µg	25-29	22-28	-
Cefoperazone	75 µg	28-34	24-33	23-29
Cefotaxime	30 µg	29-35	25-31	18-22
Cefotetan	30 µg	28-34	17-23	-
Cefoxitina	30 µg	23-29	23-29	-
Cefpodoxime	10 µg	23-28	19-25	-
Cefprozil	30 µg	21-27	27-33	-
Ceftazidime	30 µg	25-32	16-20	22-29
Ceftibuten	30 µg	27-35	-	-
Ceftizoxime	30 µg	30-36	27-35	12-17
Ceftriaxone	30 µg	29-35	22-28	17-23
Cefuroxime	30 µg	20-26	27-35	-
Cefalotina	30 µg	15-21	29-37	-
Cefditoren	5 µg	22-28	20-28	-
Cloramfenicolo	30 µg	21-27	19-26	-
Cinoxacina	100 µg	26-32	-	-
Ciprofloxacina	5 µg	30-40	22-30	25-33
Claritromicina	15 µg	-	26-32	-
Clinafloxacina	5 µg	31-40	28-37	27-35
Clindamicina	2 µg	-	24-30	-
Daptomicina	30 µg	-	18-23	-
Diritromicina	15 µg	-	18-26	-
Doxiciclina	30 µg	18-24	23-29	-
Enoxacina	10 µg	28-36	22-28	22-28
Eritromicina	15 µg	-	22-30	-
Fleroxacina	5 µg	28-34	21-27	12-20
Fosfomicina	200 µg	22-30	25-33	-
Gatifloxacina	5 µg	30-37	27-33	20-28
Gemifloxacina	5 µg	29-36	27-33	19-25
Gentamicina (1)	10 µg	19-26	19-27	16-21
Grepafloxacina	5 µg	28-36	26-31	20-27
Imipenem	10 µg	26-32	-	20-28

Allegato 4 (parte seconda)

Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test su Mueller-Hinton agar senza sangue né altri supplementi

Agenti antimicrobici	Contenuto del dischetto	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Kanamicina	30 µg	17-25	19-26	-
Levofloxacina	5 µg	29-37	25-30	19-26
Linezolid	30 µg	-	27-31	-
Lomefloxacina	10 µg	27-33	23-29	22-28
Loracarbef	30 µg	23-29	23-31	-
Meropenem	10 µg	28-34	29-37	27-33
Meticillina	5 µg	-	17-22	-
Mezlocillina	75 µg	23-29	-	19-25
Minociclina	30 µg	19-25	25-30	-
Moxalactam	30 µg	28-35	18-24	17-25
Moxifloxacina	5 µg	28-35	28-35	17-25
Nafcillina	1 µg	-	16-22	-
Acido nalidixico	30 µg	22-28	-	-
Netilmicina	30 µg	22-30	22-31	17-23
Nitrofurantoina	300 µg	20-25	18-22	-
Norfloxacina	10 µg	28-35	17-28	22-29
Ofloxacina	5 µg	29-33	24-28	17-21
Oxacillina	1 µg	-	18-24	-
Penicillina	10 unità	-	26-37	-
Piperacillina	100 µg	24-30	-	25-33
Piperacillina/Tazobactam	100/10 µg	24-30	27-36	25-33
Quinupristin/Dalfopristin	15 µg	-	23-29	-
Rifampicina	5 µg	-	26-34	-
Sparfloxacina	5 µg	30-38	27-33	21-29
Streptomina (1)	10 µg	12-20	14-22	-
Sulfisoxazolo	250 o 300 µg	15-23	24-34	-
Teicoplanina	30 µg	-	15-21	-
Telithromicina	15 µg	-	24-30	-
Tetraciclina	30 µg	18-25	24-30	-
Ticarcillina	75 µg	24-30	-	22-28
Ticarcillina/ac. clavulanico	75/10 µg	25-29	29-37	20-28
Tobramicina	10 µg	18-26	19-29	19-25
Trimethoprim	5 µg	21-28	19-26	-
Trimethoprim/Sulfametoss.(2)	1,25/23,75 µg	24-32	24-32	-
Trospectomicina	30 µg	10-16	15-20	-
Trovafloxacina	10 µg	29-36	29-35	21-27
Vancomicina	30 µg	-	17-21	-

Nota 1: per il controllo dei dischetti di gentamicina 120 µg e di streptomina 300 µg, utilizzare il ceppo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (gentamicina: 16-22 mm; streptomina: 14-19 mm).

Nota 2: per rilevare se il terreno di Mueller-Hinton ha livelli sufficientemente bassi di timidina e di timina può essere testato il ceppo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con dischetti di trimethoprim-sulfametossazolo. Un alone di inibizione ≥ 20 mm privo della crescita di piccole colonie indica un livello sufficientemente basso di timidina e di timina.

Allegato 5

Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test per *Neisseria gonorrhoeae*

Agente antimicrobico	Contenuto del dischetto	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226
Cefdinir	5 µg	40-49
Cefepime	30 µg	37-46
Cefetamet	10 µg	35-43
Cefixime	5 µg	37-45
Cefmetazolo	30 µg	31-36
Cefotaxime	30 µg	38-48
Cefotetan	30 µg	30-36
Cefoxitina	30 µg	33-41
Cefpodoxime	10 µg	35-43
Ceftazidime	30 µg	35-43
Ceftizoxime	30 µg	42-51
Ceftriaxone	30 µg	39-51
Cefuroxime	30 µg	33-41
Ciprofloxacina	5 µg	48-58
Enoxacina	10 µg	43-51
Gatifloxacina	5 µg	45-56
Fleroxacina	5 µg	43-51
Grepafloxacina	5 µg	44-52
Lomefloxacina	10 µg	45-54
Ofloxacina	5 µg	43-51
Penicillina	10 unità	26-34
Sparfloxacina	5 µg	43-51
Spectinomycin	100 µg	23-29
Tetraciclina	30 µg	30-42
Trospectomicina	30 µg	28-35
Trovafloxacina	10 µg	42-55

Allegato 6

Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test per *Streptococcus pneumoniae*

Agente antimicrobico	Contenuto del dischetto	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619
Ampicillina	10 µg	30-36
Azitromicina	15 µg	19-25
Cefaclor	30 µg	24-32
Cefdinir	5 µg	26-31
Cefditoren	5 µg	27-35
Cefixime	5 µg	16-23
Cefotaxime	30 µg	31-39
Cefpodoxime	10 µg	28-34
Cefprozil	30 µg	25-32
Ceftizoxime	30 µg	28-34
Ceftriaxone	30 µg	30-35
Cefalotina	30 µg	26-32
Cloramfenicolo	30 µg	23-27
Claritromicina	15 µg	25-31
Clinafloxacina	5 µg	27-34
Clindamicina	2 µg	19-25
Daptomicina	30 µg	19-26
Diritromicina	15 µg	18-25
Eritromicina	15 µg	25-30
Gatifloxacina	5 µg	24-31
Gemifloxacina	5 µg	28-34
Grepafloxacina	5 µg	21-28
Levofloxacina	5 µg	20-25
Linezolid	30 µg	28-34
Loracarbef	30 µg	22-28
Meropenem	10 µg	28-35
Moxifloxacina	5 µg	25-31
Nitrofurantoina	300 µg	23-29
Norfloxacina	10 µg	15-21
Ofloxacina	5 µg	16-21
Oxacillina	1 µg	8-12
Penicillina	10 unità	24-30
Quinopristin/Dalfopristin	15 µg	19-24
Rifampicina	5 µg	25-30
Sparfloxacina	5 µg	21-27
Telithromicina	15 µg	27-33
Tetraciclina	30 µg	27-31
Trimethoprim/Sulfametossazolo	1,25/23,75 µg	20-28
Trovafoxacina	10 µg	25-32
Vancomicina	30 µg	20-27

Allegato 7

Controllo di qualità dei test di sensibilità ai chemioantibiotici in agar diffusione (antibiogramma secondo Kirby e Bauer): limiti degli aloni di inibizione (mm) per singoli test per *Haemophilus influenzae*

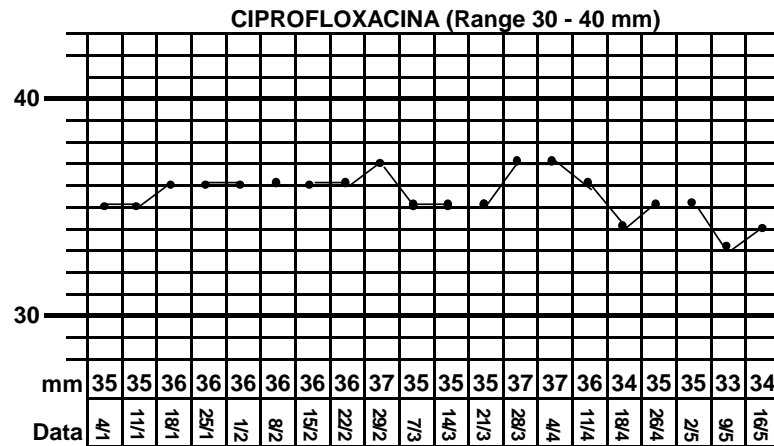
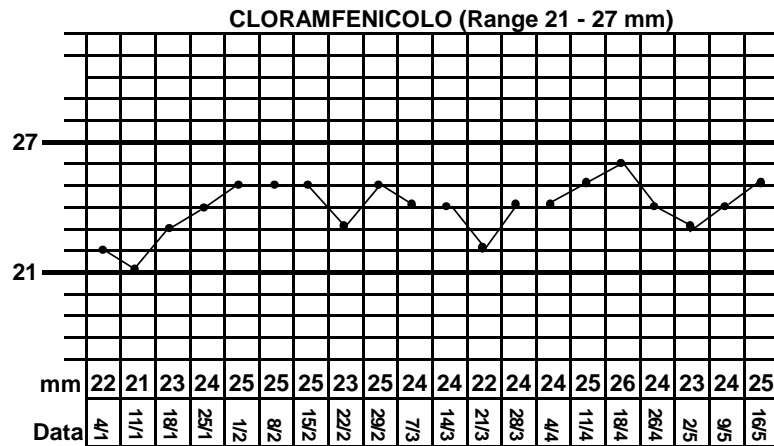
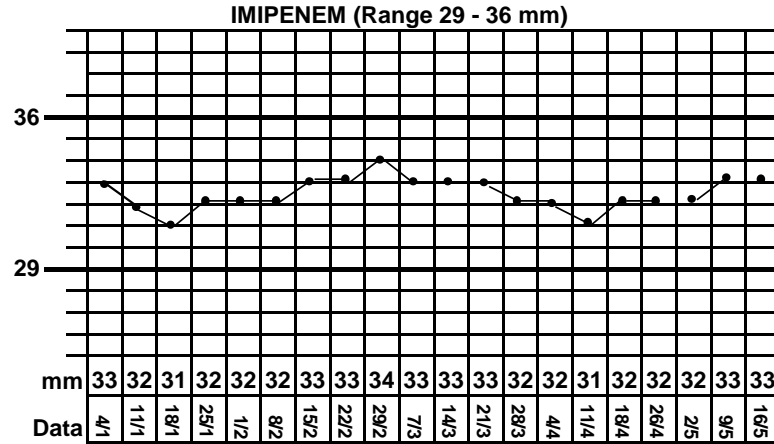
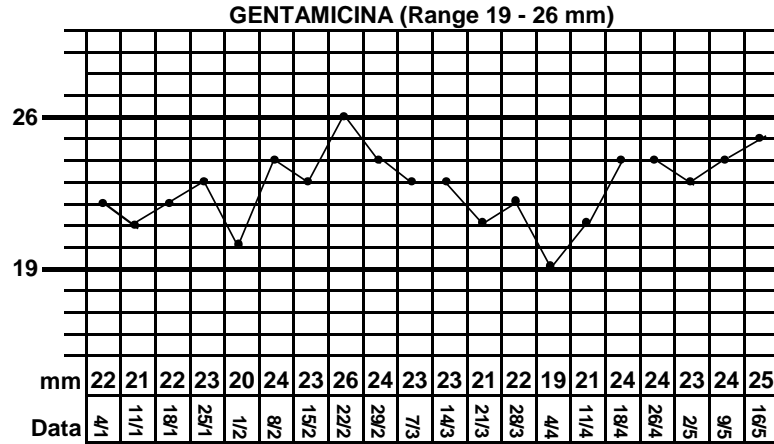
Agente antimicrobico	Contenuto dischetto	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766
Amoxicillina/Acido clavulanico	20/10 µg	15-23	-
Ampicillina	10 µg	13-21	-
Ampicillina/Sulbactam	10/10 µg	14-22	-
Azitromicina	15 µg	13-21	-
Aztreonam	30 µg	30-38	-
Cefaclor	30 µg	-	25-31
Cefdinir	5 µg	-	24-31
Cefditoren	5 µg	25-34	-
Cefepime	30 µg	25-31	-
Cefetamet	10 µg	23-28	-
Cefixime	5 µg	25-33	-
Cefmetazolo	30 µg	16-21	-
Cefonicid	30 µg	-	30-38
Cefotaxime	30 µg	31-39	-
Cefpodoxime	10 µg	25-31	-
Cefprozil	30 µg	-	20-27
Ceftazidime	30 µg	27-35	-
Ceftibuten	30 µg	29-36	-
Ceftizoxime	30 µg	29-39	-
Ceftriaxone	30 µg	31-39	-
Cefuroxime	30 µg	-	28-36
Cloramfenicolo	30 µg	31-40	-
Ciprofloxacina	5 µg	34-42	-
Claritromicina	15 µg	11-17	-
Fleroxacina	5 µg	30-38	-
Gatifloxacina	5 µg	33-41	-
Gemifloxacina	5 µg	30-37	-
Grepafloxacina	5 µg	32-39	-
Imipenem	10 µg	21-29	-
Levofloxacina	5 µg	32-40	-
Lomefloxacina	10 µg	33-41	-
Loracarbef	30 µg	-	26-32
Meropenem	10 µg	20-28	-
Moxifloxacina	5 µg	31-39	-
Ofloxacina	5 µg	31-40	-
Piperacillina/Tazobactam	100/10 µg	33-38	-
Quinopristin/Dalfopristin	15 µg	15-21	-
Rifampicina	5 µg	22-30	-
Sparfloxacina	5 µg	32-40	-
Telithromicina	15 µg	17-23	-
Tetraciclina	30 µg	14-22	-
Trimetoprim/Sulfametossazolo	1,25/23,75 µg	24-32	-
Trospectomicina	30 µg	22-29	-
Trovafloxacina	10 µg	32-39	-

Il Controllo di Qualità Interno in Microbiologia

Allegato 8

Esempio di carta di controllo per la rilevazione dell'accuratezza dei test di sensibilità ai chemioantibiotici

STIPITE DI CONTROLLO: *Escherichia coli* ATCC 25922



Allegato 9

Utilizzo dei dischetti di chemioantibiotici

Utilizzo dei dischetti:

Essi debbono essere acquistati dal commercio, con garanzia che il contenuto di antibiotico sia noto e controllato da organi ufficiali di controllo, di 6 mm di diametro e di spessore uniforme. Essi devono essere utilizzati come di seguito indicato:

- a) conservare le cartucce a +4° C, in condizioni anidre, per un periodo massimo di 6 mesi. Le cartucce di dischetti contenenti beta-lattamine debbono essere conservate a -20° C per un periodo massimo di 6 mesi, oppure a +4° C per un periodo massimo di 7 giorni;
- b) estrarre le cartucce dal frigorifero 15-60 minuti prima del loro impiego, lasciandole a temperatura ambiente, allo scopo di evitare che l'umidità dell'aria si condensi sui dischetti, alterandoli. Le cartucce possono essere anche conservate direttamente nell'applicatore, rispettando le modalità sopra ricordate.

Allegato 10

Esecuzione del test di agar diffusione secondo Kirby e Bauer

Quotidianamente è necessario porre in sottocoltura i ceppi microbici ATCC, conservati in provette a becco di clarino, su cui effettuare il test di agar diffusione. Ciò consente di verificare la purezza dello stipite prima del suo impiego e di disporre, nel contempo, di colture microbiche "fresche". Poi, è necessario procedere come di seguito indicato:

- a) prelevare con ansa sterile 4-5 colonie ben isolate e morfologicamente identiche;
- b) stemperare le colonie in una provetta con tappo a vite contenente 4 ml di brodo nutritivo (Trypticase Soy Broth; Brain Heart Infusion);
- c) agitare la brodocoltura su vortex;
- d) equilibrare la torbidità della brodocoltura con soluzione fisiologica o brodo nutritivo fino a raggiungere lo standard opacimetrico di 0,5 McFarland: controllare la correttezza della torbidità comparando, in condizioni di idonea illuminazione, la lettura di caratteri di stampa su fondo bianco attraverso la provetta in esame e la provetta contenente lo standard opacimetrico;
- e) immergere un tampone di rayon sterile nella brodocoltura, fino a completa imbibizione, entro 15 minuti dall'allestimento dell'inoculo;
- f) ruotare il tampone contro la parete interna della provetta, allo scopo di eliminare per spremitura il liquido in eccesso;
- g) strisciare il tampone sull'intera superficie della piastra;
- h) ripetere tale operazione per 3 volte, ruotando ogni volta la piastra di circa 60°;
- i) riporre le piastre così insemminate e socchiuse a temperatura ambiente per 5-10 minuti, oppure a 35° C per un periodo più breve, allo scopo di eliminare dalla superficie dell'agar ogni traccia di umidità;
- j) applicare, entro 15 minuti dal momento dell'inoculazione, i dischetti di antibiotico sulla superficie della piastra utilizzando applicatori multipli oppure applicatori singoli oppure pinzette sterili. I dischetti debbono essere posizionati a distanza di almeno 15 mm dal bordo della piastra ed a distanza di almeno 20 mm l'uno dall'altro;
- k) premere leggermente i singoli dischetti, con pinza sterile, contro la superficie del terreno, allo scopo di garantirne la massima aderenza, avendo l'avvertenza di non rimuoverli né di spostarli una volta venuti a contatto con l'agar;
- l) incubare le piastre, capovolte, entro 15 minuti dall'applicazione dei dischetti, a 35° C per 18 ore, nelle condizioni di atmosfera richieste dagli stipiti testati.

L'allegato 12 riporta in modo sinottico le modalità operative per l'esecuzione dei test di sensibilità ai chemioantibiotici sui microrganismi "esigenti".

Allegato 11

Lettura dei risultati del test di agar diffusione secondo Kirby e Bauer

Lettura dei risultati:

- dopo 18 ore di incubazione (24 ore per *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae* e *S. aureus* limitatamente all'oxacillina), misurare con righello, compasso o misuratore elettronico il diametro dell'alone di inibizione della crescita batterica circostante il dischetto, ponendosi nelle migliori condizioni di illuminazione. Gli allegati 4, 5, 6 e 7 riportano i diametri degli aloni di inibizione (minimo e massimo) nel cui range debbono essere compresi i risultati di ogni singolo test di controllo;
- riportare i risultati delle determinazioni per ciascuno stipite microbico e per ciascun antibiotico in carte di controllo apposite, predisposte in sede locale in funzione dei chemioantibiotici testati routinariamente, utilizzando i criteri NCCLS che definiscono i limiti di controllo per ciascun ceppo microbico. Un esempio di carta di controllo è riportato nell'allegato 8;
- quando si utilizza un sistema di monitoraggio della qualità con cadenza settimanale, nel caso in cui un risultato di uno o più ceppi di controllo appaia oltre tali limiti, è necessario apportare opportune azioni correttive (vedi paragrafo 5.5.2.2. al punto F).

Allegato 12

Condizioni per l'esecuzione dei test con metodica di agar diffusione per i microrganismi "esigenti"

Organismo	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Terreno	<i>Haemophilus</i> Test Medium	GC agar base arricchito con supplemento di crescita all'1%. L'uso di un supplemento privo di cisteina libera non è richiesto per i test di diffusione in agar.	Mueller Hinton Agar con sangue di montone al 5%
Inoculo	Sospensione diretta della colonia	Sospensione diretta della colonia	Sospensione diretta della colonia
Condizioni di incubazione	35° C; 16-18 ore; atmosfera al 5% di CO ₂	35° C; 20-24 ore; atmosfera al 5% di CO ₂	35° C; 20-24 ore; atmosfera al 5% di CO ₂

Allegato 13

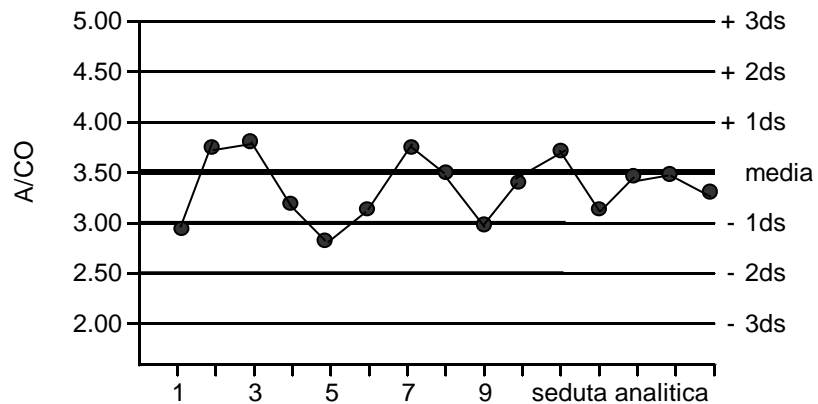
Test di screening per la rilevazione della resistenza all'oxacillina di *S.aureus* su Oxacillin-Salt Agar

Parametri	Modalità operative
Terreno	Mueller Hinton Agar con sale (NaCl 4% w/v; 0,68 mol/l)
Concentrazione nel terreno di: * oxacillina * meticillina	* 6 µg/ml * 10 µg/ml
Stipiti di controllo	<i>S. aureus</i> ATCC 29213, ceppo sensibile <i>S. aureus</i> ATCC 43300, ceppo resistente
Inoculo batterico: * modalità di allestimento * torbidità	* sospensione diretta delle colonie batteriche in brodo nutritivo * 0,5 McFarland
Insemezzamento dell'inoculo	* con tampone, spatolare la superficie dell'agar, oppure * con tampone, deporre una goccia sulla superficie dell'agar, oppure * con puntale sterile, deporre 10 µl sulla superficie dell'agar
Condizioni di incubazione	35° C; atmosfera aerobia; 24 ore
Modalità di lettura	esaminare a luce trasmessa
Risultati	crescita > 1 colonia = ceppo resistente

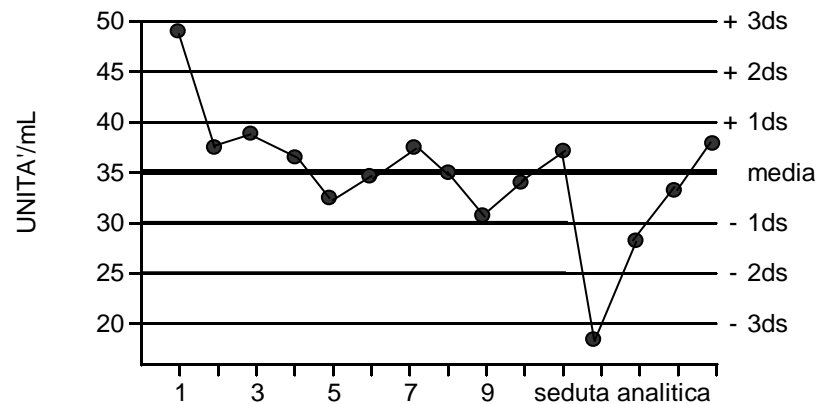
Il Controllo di Qualità Interno in Microbiologia

Allegato 14

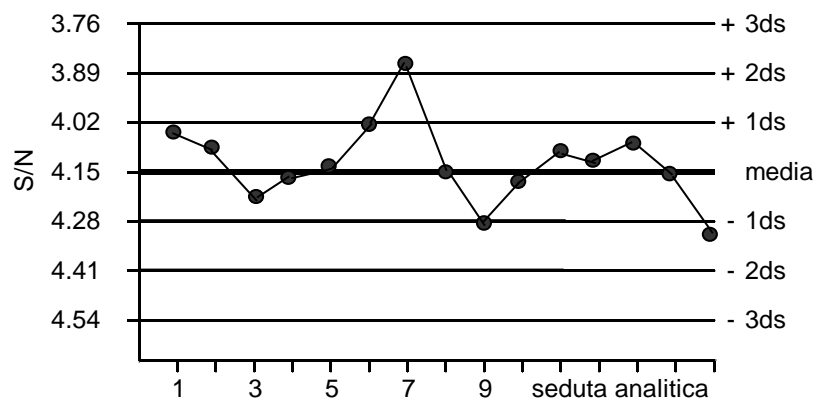
Esempi di carte di controllo per sieroimmunologia



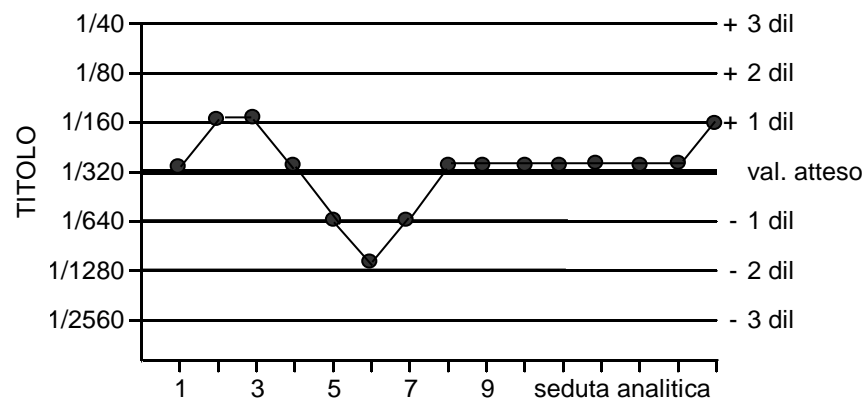
A) Carta di controllo per anticorpi anti-HIV



B) Carta di controllo per anticorpi totali anti-toxoplasma



C) Carta di controllo per HBsAg



D) Carta di controllo per sierologia Lue (test TPFA)

5.8. BIBLIOGRAFIA

- Associazione Microbiologi Clinici Italiani. Il controllo di qualità in microbiologia. Quaderni di Microbiologia Clinica. Vol. 4. Ed. Biomedica Srl, Via C. Farini 70, 20159 Milano 1993.
- August MJ, Hindler JA, Huber TW, Sewee DL. Cumitech 3A. Quality Control and Quality Assurance practices in clinical microbiology. Coordinating ed, AS Weissfeld. American Society for Microbiology. Washington DC 1990.
- Broughton PMG *et al.* Guidelines for the evaluation of diagnostic kits. Part 2. General principles and outline procedures for the evaluation of kits for qualitative tests. ECCLS document ISSN 1011-6265 1987.
- Cheesbrough M. Medical laboratory manual for tropical countries. Butterworths Publ, Borough Green, Sevenoaks, Kent, England 1999.
- Comitato Regionale per l'Ordinamento dei Servizi di Patologia. Manuale del controllo di qualità nel laboratorio di Patologia Clinica. Giunta Regionale della Lombardia, Assessorato alla Sanità 1978.
- Constantine NT *et al.* Retroviral Testing. Essentials for Quality Control and laboratory diagnosis. CRC Press London 1992.
- De Stasio G *et al.* Linee guida per la prevenzione delle malattie infettive trasmissibili con la trasfusione. Il Servizio Trasfusionale 1995; 3.
- Garcia L.S., Bruckner D.A. Diagnostic medical parasitology. AMS Press Publ, Washington DC 1998.
- Grigis A, Manisco A, Goglio A. Controllo di qualità delle apparecchiature. Becton Dickinson 1998
- Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Vol. 2°, sez. 12. American Society for Microbiology, Washington DC 1994.
- Isenberg HD. Essential Procedures for Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC 1998.
- Monoharmont P *et al.* La validation d'un témoin interne multiparamétrique: aspects pratiques. La Gazette de la Transfusion 1995; 124: 35-8.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. Internal Quality Control testing: principles and definitions, Proposed Guideline. Vol.5, n.8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova. Pa 1985.
- Public Health Laboratory, Quality Assurance Laboratory. Internal Quality Control for serodiagnosis: principles and practice. PHLS London 1993.

Il Controllo di Qualità Interno in Microbiologia

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 3rd ed. Approved Standard NCCLS document M11-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1993.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Second Edition; Approved Standard NCCLS document M22-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1996.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protocols for evaluating dehydrated Mueller-Hinton agar; Approved Standard NCCLS document M6-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1996.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Quality Assurance for commercially prepared microbiological culture media. Approved Standard NCCLS document M22-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1996.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7th ed. Approved Standard. NCCLS document M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa 2000.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved Standard. NCCLS document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 2000.
- Snell JJS. Introduction: General aspects of quality control. In: Quality control: principles and practice in the microbiology laboratory. Eds Snell JJS, Farrell ID, Roberts C. PHLS London 1991; 13-7.
- Westgard JO *et al.* Quality management. In: Henry JB ed. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 18th ed. Philadelphia: WB Saunders 1991: 81-100.
- World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardisation. Hepatitis B Surface Antigen. Tech Rep Ser 1987; 18: 745.

6.

PROGRAMMA “MINIMO” DI ANATOMIA PATOLOGICA

6.1. Premessa	Pag. 83
6.2. Accettazione	Pag. 83
6.3. Tempi di refertazione	Pag. 84
6.4. Accuratezza diagnostica	Pag. 84
6.5. Bibliografia	Pag. 86

PAGINA BIANCA

6.1. PREMESSA

Nell'ambito dei Servizi di Medicina di Laboratorio il settore dell'Anatomia Patologica ha affrontato più recentemente il tema dei controlli di qualità sia interni, sia esterni tesi a verificare, mediante tecniche e attività a carattere operativo, che siano soddisfatti i requisiti per la qualità dei processi e che siano eliminate le cause di prestazioni insoddisfacenti.

Per avviare il processo di adeguamento alle tecniche del Controllo di Qualità, tra le varie misure da intraprendere, è sicuramente necessario definire la tipologia dei controlli di qualità interni che ogni unità operativa di Anatomia Patologica deve effettuare dandone periodicamente evidenza documentale.

In questo capitolo sono stati individuati i requisiti che ciascuna unità operativa (o ciascun laboratorio che effettui una o tutte le attività previste) deve verificare continuamente, dandone evidenza documentale mediante rapporti mensili, trimestrali, semestrali e annuali che permettano di verificare l'andamento nel tempo dei controlli effettuati.

Tale documentazione, oltre all'uso interno ai fini dell'adozione di idonee azioni correttive in caso di significativi scostamenti dagli standard, deve essere conservata per almeno un anno.

Di seguito si elencano le attività controllate e i relativi standard.

6.2. ACCETTAZIONE

Il momento dell'accettazione dei campioni biologici da esaminare può permettere di evidenziare le cause di errore della fase pre-analitica e pertanto la rilevazione di ogni non conformità e l'adozione di idonee azioni correttive è in grado di introdurre un significativo miglioramento del processo diagnostico.

Le possibili cause di non conformità in accettazione sono state così identificate:

- scorretta e/o incompleta identificazione dei campioni;
- scorretta e/o incompleta identificazione del paziente;
- mancata indicazione della sede del prelievo;
- mancata indicazione della procedura dei prelievi;
- mancata indicazione di dati clinici rilevanti;
- mancata indicazione di dati di laboratorio e/o strumentali;
- mancata indicazione del quesito diagnostico;
- mancata indicazione del medico e/o reparto richiedente.

È considerato accettabile il seguente standard:

$$\frac{\text{n° di NC complessivamente rilevate}}{\text{n° di campioni biologici accettati}} \leq 0,2\%$$

6.3. TEMPI DI REFERTAZIONE

Il tempo intercorrente tra l'accettazione del caso e la sua refertazione è sicuramente considerato il requisito atto ad assicurare la tempestività della risposta. Esso è noto in letteratura come T.A.T. (Turn Around Time) e nelle attività di Anatomia Patologica deve essere calcolato con specifico riferimento alle diverse tipologie di attività e registrato continuativamente dandone evidenza documentale con periodicità mensile, trimestrale, semestrale e annuale.

Nella tabella sottostante, nella parte sinistra, vengono riportate le attività che devono essere tenute sotto controllo, mentre nella parte destra vengono indicati i T.A.T. ideali che dovrebbero essere raggiunti.

ATTIVITA'	T.A.T. NON SUPERIORE A:
Citologia diagnostica clinica	3 gg. lavorativi
Citologia da screening	15 gg. lavorativi
Istologia:	
• esami eseguibili rapidamente (piccole biopsie)	3 gg. lavorativi
• esami normali (pezzi operatori)	4 gg. lavorativi
• esami prolungati (osso, linfonodi, ICC)	5 gg. lavorativi
Esami intra operatori	18 minuti
Riscontri diagnostici	
• diagnosi provvisoria	2 gg. lavorativi
• diagnosi definitiva	30 gg. lavorativi
Tecniche di citofluorimetria e di biologia molecolare	14 gg. lavorativi

6.4. ACCURATEZZA DIAGNOSTICA

L'accuratezza in anatomia patologica va verificata mediante calcoli che non fanno riferimento a misure di valori numerici confrontati rispetto ad un campione di valore noto, ma che scaturiscono dalla revisione di casi o tra pari o effettuate dallo stesso operatore in momenti e con metodiche diverse. In pratica tale tecnica permette di valutare il tasso di accuratezza classificando con 4 gradi diversi di giudizio le principali attività svolte nei servizi di Anatomia Patologica e precisamente:

a) verifica dell'accuratezza in citologia agoaspirativa clinica

diagnosi citoagoaspirativa

diagnosi istologica di successiva biopsia

standard ottimale (*):	diagnosi corretta	≥ 95%
	imprecisione minore	≤ 5%
	imprecisione maggiore	tendente a 0%
	diagnosi errata	tendente a 0%

b) verifica dell'accuratezza dell'esame intra operatorio estemporaneo al criostato

	<u>diagnosi al criostato</u>	
	diagnosi sul pezzo definitivo	
standard ottimale (*):	diagnosi corretta	≥ 90%
	imprecisione minore	≤ 3%
	imprecisione maggiore	tendente a 0%
	diagnosi errata	tendente a 0%
	risposta differita	≤ 7%

c) verifica dell'accuratezza della citologia cervico-vaginale (pap-test) con verifica random del 10% degli esami negativi, letti dal primo esaminatore, da parte di un supervisore

	<u>diagnosi del primo esaminatore</u>	
	diagnosi del supervisore	
d) standard ottimale (*):	diagnosi corretta	≥ 95%
	imprecisione minore	≤ 5%
	imprecisione maggiore	tendente a 0%
	diagnosi errata	tendente a 0%

verifica dell'accuratezza della citologia cervico-vaginale (pap-test) mediante revisione sulla relativa biopsia consecutiva

	<u>diagnosi citologica</u>	
	diagnosi istologica	
standard ottimale (*):	diagnosi corretta	≥ 97%
	imprecisione minore	≤ 3%
	imprecisione maggiore	tendente a 0%
	diagnosi errata	tendente a 0%

e) verifica di casi istologici comunque revisionati (recidive, richiesta dal reparto, richieste esterne, autopsie, ulteriore esame istologico ecc.)

	<u>diagnosi al primo esame</u>	
	diagnosi alla revisione	
standard ottimale (*):	diagnosi corretta	≥ 96%
	imprecisione minore	= 4%
	imprecisione maggiore	tendente a 0%
	diagnosi errata	tendente a 0%

(*) livello di prestazione che dovrebbe idealmente essere raggiunto.

6.5. BIBLIOGRAFIA

- Andrion A, Gaglio A, Langè A, Giudici M, Grasso G, Amore M, Bondi A, Cristofori E, *et al.* Audit dell'attività istopatologica nei servizi di sette ospedali generali: 2. Tempi di risposta. *Pathologica* 1996; 88: 181-7
- Collazzo R. Indicatori di qualità in Anatomia Patologica. *Pathologica* 1998; 90: 371-8
- Cowan DF. Quality Assurance in Anatomic Pathology. An information system approach. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 129-34
- Howanitz PJ, Hoffman GG, Zarbo RJ. The Accuracy of Frozen-Section Diagnoses in 34 Hospitals. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 355-9
- Howanitz PJ. Quality Assurance measurements in departments of Pathology and Laboratory Medicine. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 1131-5
- Leslie KO, Fechner RE, Kempson RL. Second Opinions in Surgical Pathology. *Am J Surg Pathol* 1996; 101 (s): 558-64
- Pirini MG, Eusebi V. Il controllo di qualità delle diagnosi intraoperatorie. *Pathologica* 1996; 88: 29-35
- Ramsay AD, Callagher PJ. Local audit of Surgical Pathology. 18 months' experience of peer review-based Quality Assessment in a english teaching hospital. *Am J Surg Pathol* 1992; 16 (5): 476-82
- Rickert RR. Quality Assurance goals in Surgical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 1157-62
- Travers H. Quality Assurance indicators in Anatomic Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 1149-56
- Thomas J st J, Lessells AM, McIntyre MA, Klys HS, Webb JM. Prospective study of quantitative aspects of audit in a large general histopathology laboratory. *J Clin Pathol* 1991; 44: 921-31

7.

ALLEGATI

In questa sezione vengono riportate, come esempio, alcune schede per la rilevazione dei dati di controllo di alcune strumentazioni comuni a tutte le branche della medicina di laboratorio.

1. Scheda apparecchiatura	Pag. 89
2. Scheda termostato	Pag. 91
3. Scheda termostato CO ₂	Pag. 92
4. Scheda bagnomaria	Pag. 93
5. Scheda stufe a secco	Pag. 94
6. Scheda frigorifero	Pag. 95
7. Scheda frigorifero con disco di controllo	Pag. 96
8. Scheda cella frigorifera	Pag. 97
9. Scheda congelatore -20° C	Pag. 98
10. Scheda congelatore -80° C	Pag. 99
11. Scheda pHmetro	Pag. 100

PAGINA BIANCA

Scheda 1 (parte prima)

SCHEDA APPARECCHIATURA

Scheda n°

Apparecchiatura

Modello N° serie

Ubicazione Inventario n°

Ditta produttrice

Ditta fornitrice

Assistenza

Referente tel/fax

Indirizzo

Acquisto Si No Donazione Si No

Inclusive service Si No Visione Si No

Delibera/autorizzazione n° del: ___/___/___

Consegnato il ___/___/___ Bolla o equivalente Si No

Installato da il: ___/___/___

Manuale tecnico Si No

Collaudato da il: ___/___/___

Certificato collaudo Si No

Verifica funzionale: supervisore

Alienato/reso il ___/___/___

(v. retro)

Scheda 1 (parte seconda)

MATERIALE DI RICAMBIO

Codice	Descrizione	Ditta
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----

MANUTENZIONE ORDINARIA

Periodicita'	Tipo	Responsabile
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----

MANUTENZIONE STRAORDINARIA

Data	Errori o problemi segnalati	Soluzione
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----
-----	-----	-----

Scheda 2

TERMOSTATO:

MESE..... ANNO.....

Scheda/inventario n°

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	t° minima <small>(non < 3° C rispetto al valore impostato)</small>	temperatura massima							umidità	NOTE
			32	33	34	35	36	37	38		
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30											
31											

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)

t° massima: controllare e riportare i valori di temperatura

t° minima: controllare e riportare i valori di temperatura

umidità: controllare il livello di acqua nell'apposito contenitore

Scheda 3

TERMOSTATO CO₂:

MESE..... ANNO.....

Scheda/inventario n°..... Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	% CO ₂ (5-7 %)	t° minima <small>(non < 3° C rispetto al valore impostato)</small>	temperatura massima							umidità	NOTE
				32	33	34	35	36	37	38		
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												
23												
24												
25												
26												
27												
28												
29												
30												
31												

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)

- t° massima: controllare e riportare i valori di temperatura
- t° minima: controllare e riportare i valori di temperatura
- umidità: controllare il livello di acqua nell'apposito contenitore
- percentuale CO₂ (5-7%): controllare e riportare il valore di percentuale

Scheda 4

BAGNOMARIA:

MESE..... ANNO.....

Scheda/inventario n°.....

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	liv. acqua	temperatura massima							torbidità	NOTE
			33,5	34	34,5	35	35,5	36	36,5		
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30											
31											

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)
temperatura: controllare e riportare i valori di temperatura
livello acqua: controllare il livello di acqua nell'apposito contenitore
contaminazione acqua: controllare la torbidità

Scheda 6

FRIGORIFERO:

MESE.....ANNO.....

Scheda/inventario n°.....

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	t° minima <small>(non < 3° C rispetto al valore impostato)</small>	temperatura minima							NOTE
			1	2	3	4	5	6	7	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)

t° massima: controllare e riportare i valori di temperatura

t° minima: controllare e riportare i valori di temperatura

Scheda 7

FRIGORIFERO CON DISCO DI CONTROLLO:

MESE..... ANNO.....

Scheda/inventario n°.....

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	temperatura	CAMBIO DISCO	NOTE
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)

t° massima: controllare e riportare i valori di temperatura

t° minima: controllare e riportare i valori di temperatura

Scheda 8

CELLA FRIGORIFERA:

MESE.....ANNO.....

Scheda/inventario n°.....

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	t° minima <small>(non < 3° C rispetto al valore impostato)</small>	temperatura minima							NOTE
			1	2	3	4	5	6	7	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)
t° massima: controllare e riportare i valori di temperatura
t° minima: controllare e riportare i valori di temperatura

Scheda 9

CONGELATORE -20° C:

MESE..... ANNO.....

Scheda/inventario n°.....

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	t° massima <small>(non > -16° C)</small>	temperatura minima							NOTE
			-26	-24	-22	-20	-18	-16	-14	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)

t° massima: controllare e riportare i valori di temperatura

t° minima: controllare e riportare i valori di temperatura

Scheda 10

CONGELATORE -80° C:

MESE..... ANNO.....

Scheda/inventario n°.....

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	t° massima <small>(non > -76° C)</small>	temperatura minima							NOTE
			-74	-76	-78	-80	-82	-84	-86	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										

PARAMETRI DA CONTROLLARE: (Se fuori dal range indicato, avvisare il)

t° massima: controllare e riportare i valori di temperatura

t° minima: controllare e riportare i valori di temperatura

Scheda 11

pH metro:

MESE..... ANNO.....

Scheda/inventario n°.....

Responsabile raccolta dati:.....

DATA	OPERATORE	CALIBRAZIONE (ad ogni uso)	RICARICA PILA (mensile)	NOTE
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				

NOTA: Dopo l'uso riporre il pH metro in soluzione di KCl 3M +AgCl 3M.
Rabbonciare la soluzione elettrolita, quando necessario.