



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE**

Metodi e tecniche di diagnostica integrata

Lezione 1

Serena Bonin

Più di 2/3 delle decisioni mediche si basano su risultati di laboratorio



La spesa relativa è < 5% della spesa sanitaria



Elevato valore clinico informativo »a basso costo«



Laboratori diagnostici

Professionalità e specializzazioni diverse che partecipano nella produzione di una MISURA che il medico utilizzerà nel processo clinico



Qualità del prodotto= rispondenza al valore reale, tempi di esecuzione.....



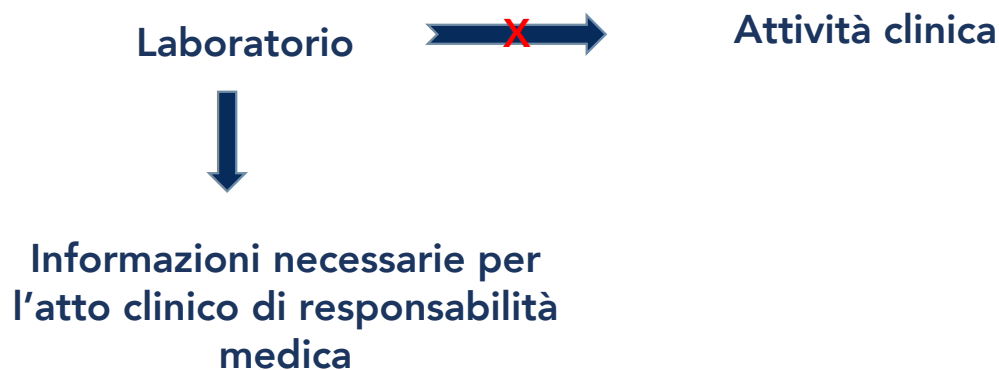
Efficacia dell'azione medica conseguente.....



Funzioni del Laboratorio diagnostico

Assistere il medico nella:

- ✓ Scoperta della malattia o predisposizione ad essa
- ✓ Conferma dell'ipotesi diagnostica
- ✓ Scelta e monitoraggio della terapia
- ✓ Definizione della prognosi



TEST DIAGNOSTICI NON RICHIESTI DAL MEDICO
SCREENING DI POPOLAZIONI DI MASSA
SCREENING DI POPOLAZIONE MIRATO (SOGGETTI A RISCHIO)
TEST DIAGNOSTICI RICHIESTI DAL MEDICO
A SCOPO DIAGNOSTICO
A SCOPO DI FOLLOW-UP
A SCOPO PROGNOSTICO



Organizzazione del Laboratorio diagnostico



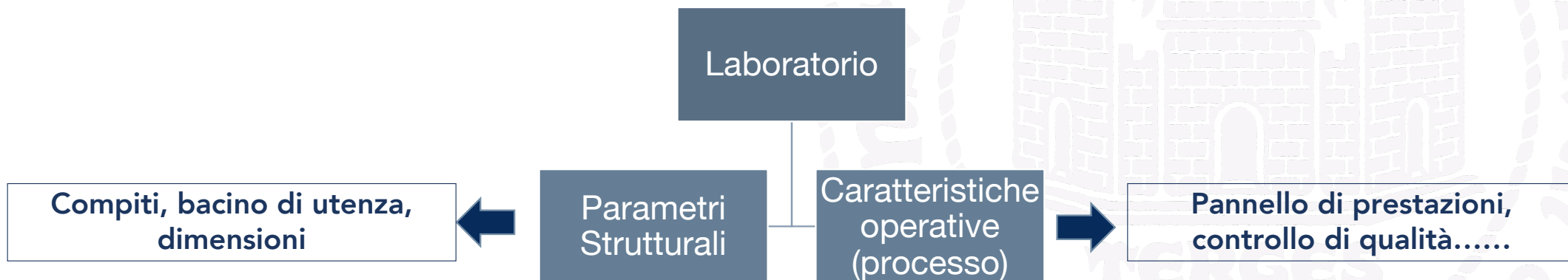
Multidisciplinare



Area servizi diagnostici



Integrazione in un'unica struttura di laboratori diversi



Il referto di lab. ha un valore in termini di grandezze misurate e un peso in termini di qualità e affidabilità che derivano da:

- ✓ Controlli di validazione e qualità
- ✓ Qualità del sistema di refertazione e archiviazione del dato
- ✓ Qualità dei protocolli di comunicazione con utente finale (paziente) e con quello intermedio (operatori sanitari)
- ✓ Attività di ricerca legate direttamente o indirettamente al lab.

LABORATORIO DI REPARTO

Poche linee analitiche:

- Test semiquantitativi
- Apparecchiature dedicate ad alta tecnologia
- Personale medico o infermieristico

LABORATORIO GENERALE

Numerose linee analitiche automatizzate o manuali:

- Test quantitativi
- Apparecchiature automatizzate e pannelli analitici
- Personale biologo, medico, chimico, tecnico

LABORATORIO SPECIALISTICO

Linee analitiche dedicate (es immunologia, endocrinologia):

- Test quantitativi
- Apparecchiature automatizzate
- Personale biologo, medico, chimico, tecnico



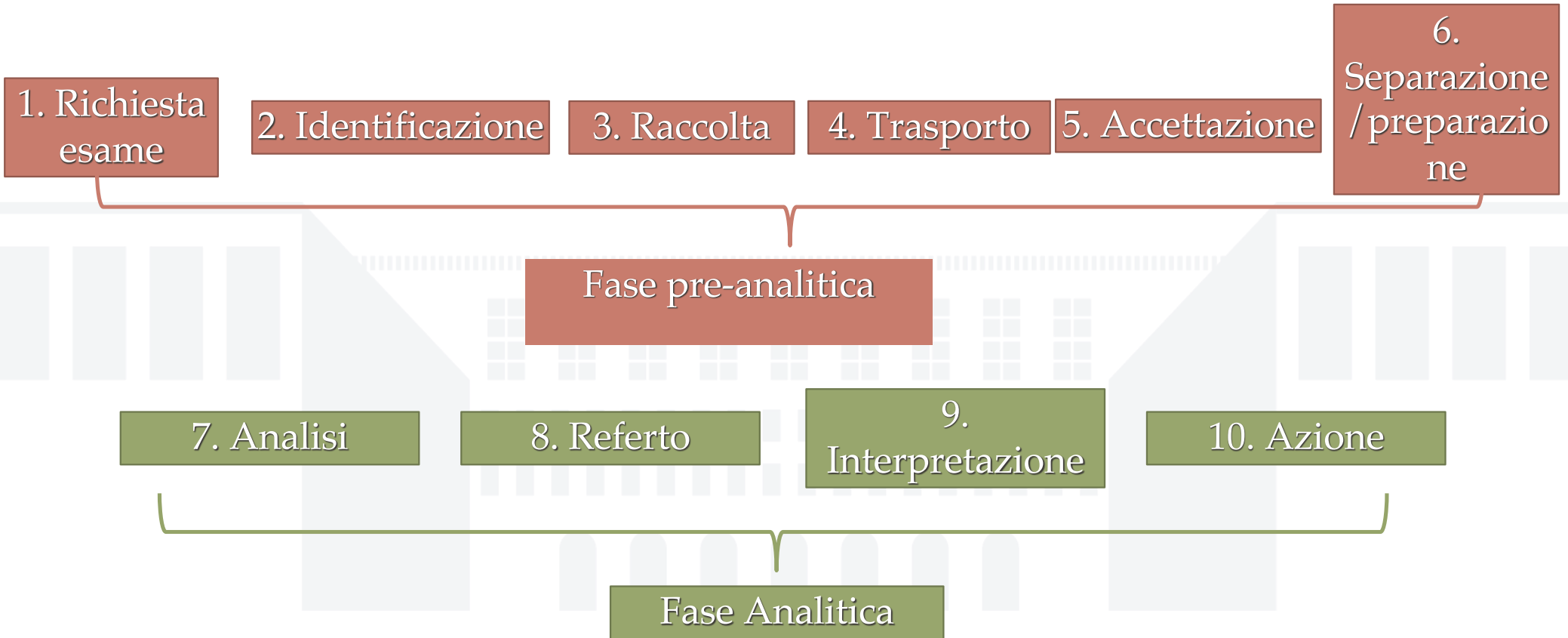
CICLO ANALITICO NEL LABORATORIO



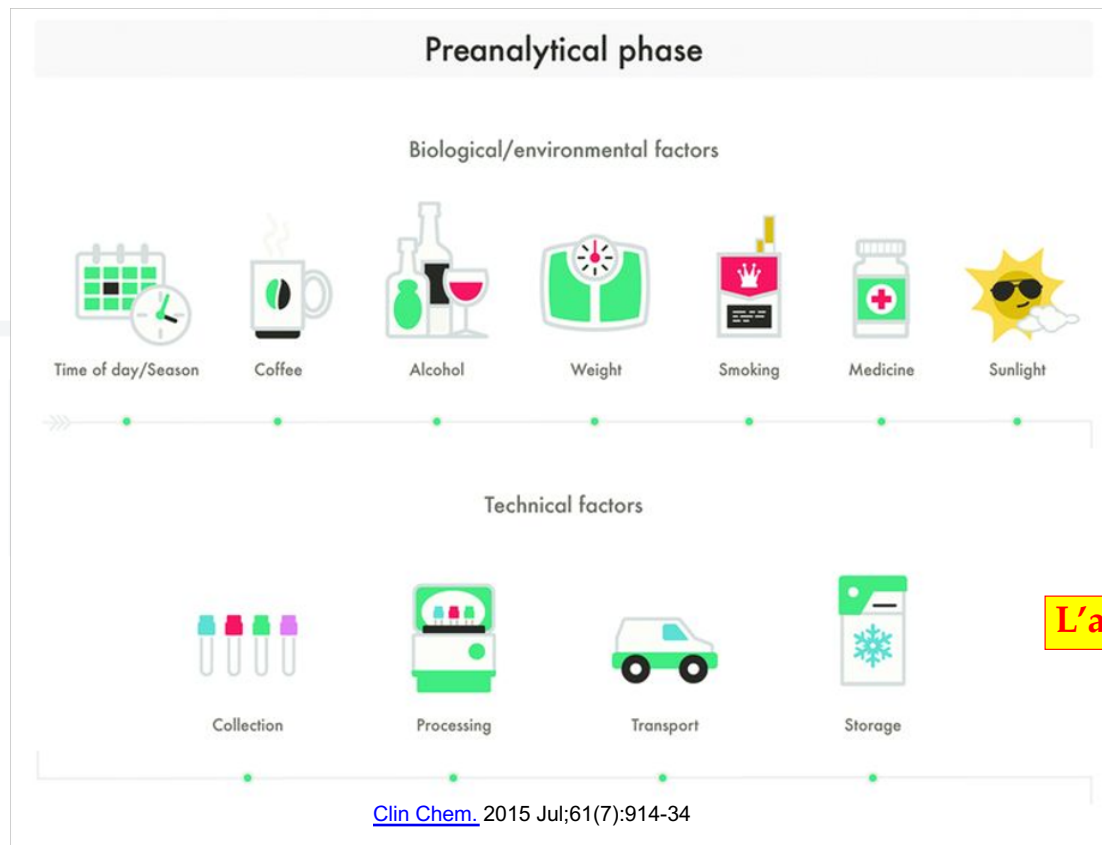
BASSA AUTOMAZIONE	MEDIA AUTOMAZIONE	ALTA AUTOMAZIONE
1. Registrazione Manuale 2. Verifica sist gestionale	1. Registrazione Manuale 2. Verifica sist gestionale	1. Identificazione e gestione automatizzata
3. Inser. centrifuga 4. Centrifugazione 5. Estrazione da centrifuga 6. Suddivisione per analisi 7. Stappatura provette 8. Distribuzione provette	3. Centrifugazione batch	2. Centrifugazione batch
9. Check visivo 10. Caricamento piatto	4. Caricamento batch	3. Caricamento batch
11. Analisi	5. Analisi	4. Analisi
12. Validazione risultati 13. Delta check 14. Ripetizione non validati 15. Reflex testing 16. Conservazione campione	6. Validazione risultati 7. Delta check 8. Ripetizione non validati 9. Reflex testing 10. Conservazione campione	5. Autovalidazione e reflex testing
17. Invio referto	11. Invio referto	6. Invio referto

Delta Check (differenza tra due campioni in assoluto, in percentuale e riferita al tempo trascorso)
reflex testing è la ripetizione del campione. È ben conosciuto e praticato in numerosi laboratori clinici come strumento di appropriatezza. Un valore di tirotropina (TSH) aumentato/diminuito genera la determinazione automatica di free T4 (ed eventualmente degli anticorpi anti-perossidasi), ed analogamente per il PSA totale nei confronti del PSA libero, ed in altri numerosi casi.

CICLO ANALITICO NEL LABORATORIO



FASE PREANALITICA



1. Per lo più fuori dal lab
2. Più difficile da controllare
3. Coinvolgimento di diverse figure professionali
4. L'isolamento delle biomolecole (DNA, RNA, proteine, ccf-DNA, miRNA...) è parte della fase pre-analitica

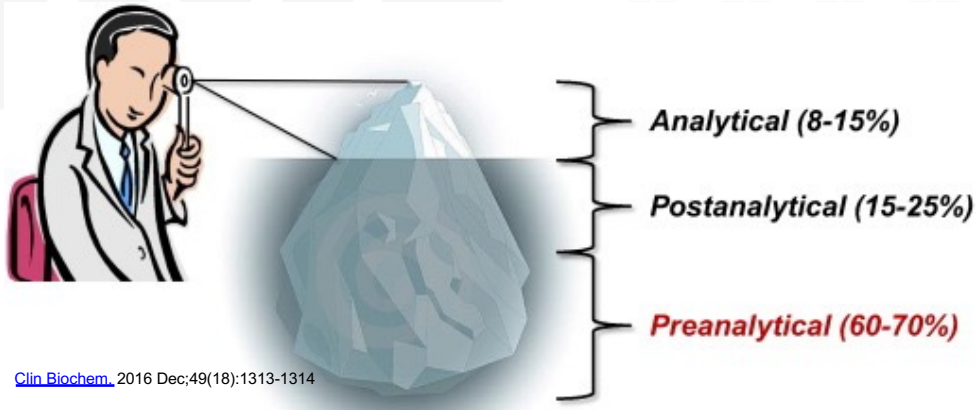
L'analisi definisce i processi pre-analitici da applicare



➤ Errori nei processi pre-analitici rappresentano più del 50% degli errori attribuiti ai laboratori diagnostici (Medical Laboratory Observer, May 2014)

➤ La standardizzazione dei processi pre-analitici è fondamentale per garantire un processo analitico affidabile

➤ Domanda sempre maggiore di biomarcatori per una medicina di precisione



[Clin Biochem](#), 2016 Dec;49(18):1313-1314



SISTEMA QUALITA`

QUALITA` DEL PRODOTTO

QUALITA` DEL PROCESSO



QUALITA` TOTALE

- ✓ Qualità tecnica del processo analitico
- ✓ Qualità del processo di comunicazione interno ed esterno
- ✓ Qualità del contenuto scientifico e della ricerca svolta nel laboratorio
- ✓ Sistema di gestione per la qualità



NORME NAZIONALI E INTERNAZIONALI

ENTI DI ACCREDITAMENTO

Certificazione di Sistema
Certificazione di prodotto

Cosa è una norma o uno standard?



ACCREDITAMENTO

È il riconoscimento formale **dell'idoneità di un laboratorio** ad effettuare specifiche **prestazioni diagnostiche**. È un requisito che occorre acquisire per poter erogare prestazioni. Questo requisito è normalmente espresso in forma di un manuale contenente tutte le dotazioni minime necessarie per poter diventare e/o permanere una delle strutture autorizzate ad erogare prestazioni per nome e conto del SSR.

Dotazioni organizzative, strutturali e strumentali.

CERTIFICAZIONE

È su base strettamente volontaria. L'azienda o un lab richiede ad un ente certificatore che con un ispezione certifica l'aderenza alla norma ISO 15189
Dotazioni organizzative, strutturali e strumentali.

Gli elementi da considerare nella realizzazione della qualità dei servizi sanitari sono riconducibili alle seguenti categorie fondamentali: :

- ✓ adeguata organizzazione della struttura e corretta gestione delle risorse e dei processi
- ✓ adeguata definizione del contenuto "tecnico" dei servizi
- ✓ adeguata qualificazione del personale
- ✓ corretta esecuzione delle attività di analisi e diagnostica
- ✓ Standard espressi dalle norme: ISO/IEC 17025 ISO 15189



è il documento di accreditamento di tutti i tipi di laboratorio clinico: chimica clinica, istopatologia, microbiologia clinica, medicina trasfusionale

Favorisce un approccio comune nella gestione in qualità dei laboratori clinici in tutti gli aspetti del loro funzionamento:

- ✓ preparazione ed identificazione del paziente
- ✓ raccolta ed esame di campioni clinici
- ✓ personale addetto a tali servizi;

Controllo del processo

ISO 15189

REQUISITI DEL SISTEMA



REQUISITI TECNICI



Responsabilità della Direzione

La Direzione ha la responsabilità finale circa la progettazione, l'applicazione, il mantenimento ed il miglioramento del sistema qualità... deve:

- ✓ costruire e gestire una struttura organizzativa e gestionale ...;
- ✓ definire specifici ruoli, responsabilità ed interrelazioni di tutto il personale;
- ✓ garantire un adeguato addestramento a tutto il personale ed una periodica rivalutazione delle competenze.

Personale

Infrastrutture e caratteristiche ambientali
Strumentazione di laboratorio

Fase preanalitica

SISTEMA DI GESTIONE DELLA QUALITA'



•**Requisiti generali:** l'Organizzazione sanitaria deve identificare i suoi processi (diagnostici, terapeutici, amministrativi, etc ...), stabilire le interazioni fra questi, definire le risorse necessarie e le modalità di funzionamento e controllo.

•**Requisiti sulla documentazione:** l'Organizzazione deve descrivere il suo Sistema di Gestione per la Qualità (SGQ) mediante Politica, Obiettivi, Standard, Manuale, Procedure, Istruzioni, sistema di Registrosioni.

Controllo del processo

Requisiti sulla documentazione



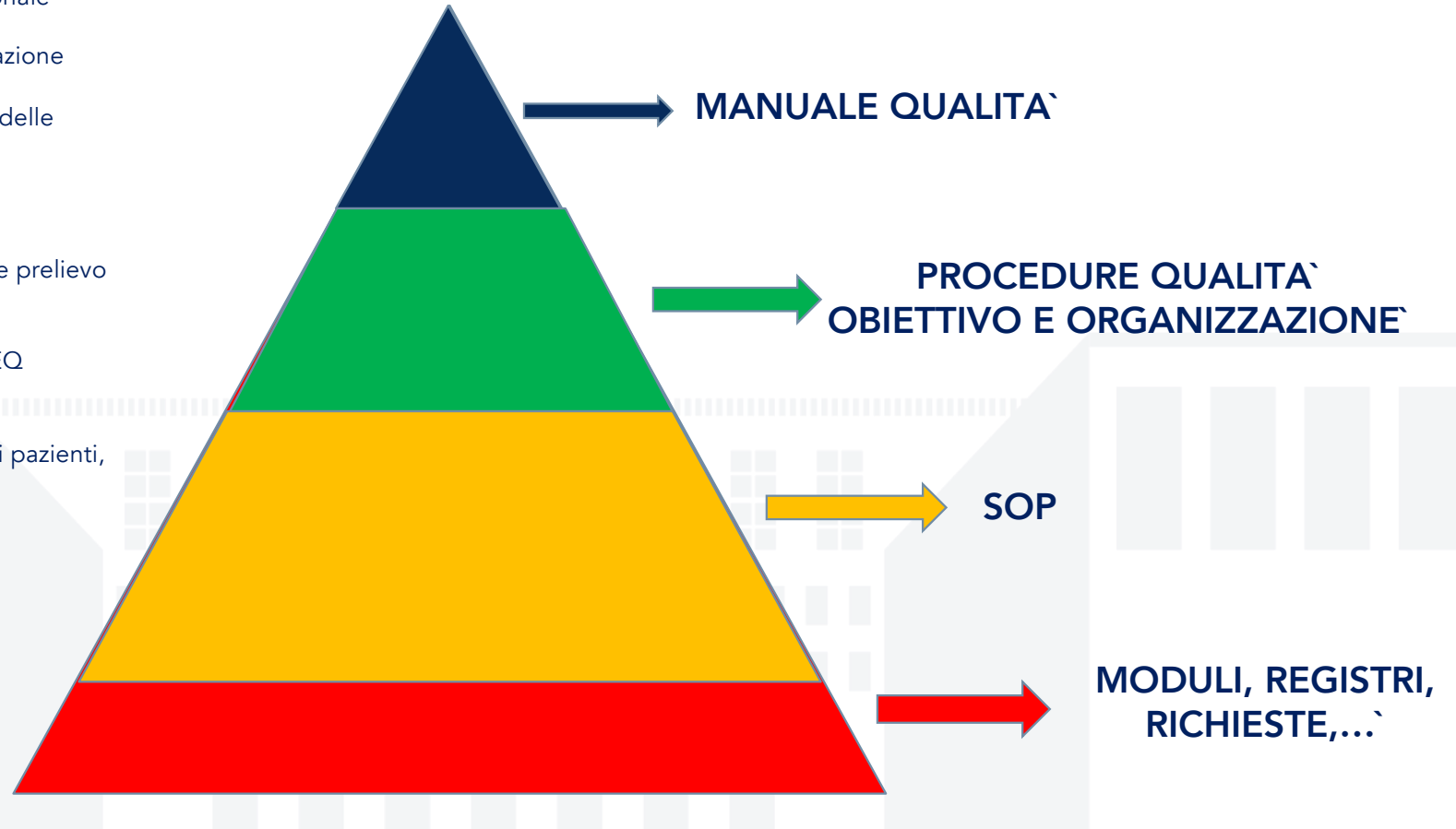
- Politica ed obiettivi per la qualità
- Manuale della qualità
- Procedure documentate richieste dalla norma
- Documenti necessari per pianificazione, funzionamento e controllo dei processi
- Registrosioni richieste dalla norma

Il M.Q. deve contenere :

- descrizione del laboratorio ...
- politica della Qualità
- informazione ed addestramento del personale
- controllo dei documenti
 - registrazione, conservazione ed archiviazione
 - gestione di strumentazione, reagenti, consumabili - - procedura di validazione delle metodiche analitiche - sicurezza
 - aspetti ambientali ...
- ricerca e sviluppo (se applicabile)
- lista degli esami
- profili diagnostici, modalità di raccolta e prelievo dei campioni
- validazione dei risultati
- controlli di qualità eseguiti, compresa VEQ
- refertazione dei risultati
- azioni correttive e gestione dei reclami
- comunicazione ed altre interazioni con i pazienti, gli operatori
- laboratori di riferimento e fornitori
- verifiche ispettive interne
- etica

ISO 15189

Controllo del processo



CONTROLLO DEL PRODOTTO



CORRISPONDENZA DEL PRODOTTO ALLE SPECIFICHE RICHIESTE



3 LIVELLI DI CONTROLLO:

1. **Validazione iniziale del metodo di produzione**
2. **Controllo di qualità continuo** con le due categorie del controllo statistico di qualità (CQ, SCQ, controllo interno di qualità) e del controllo interlaboratori (VEQ, valutazione esterna di qualità, proficiency testing)
3. **Validazione del dato prima del suo rilascio**

CQ E VEQ



RESPONSABILITA' INTEGRALE DEL LABORATORIO

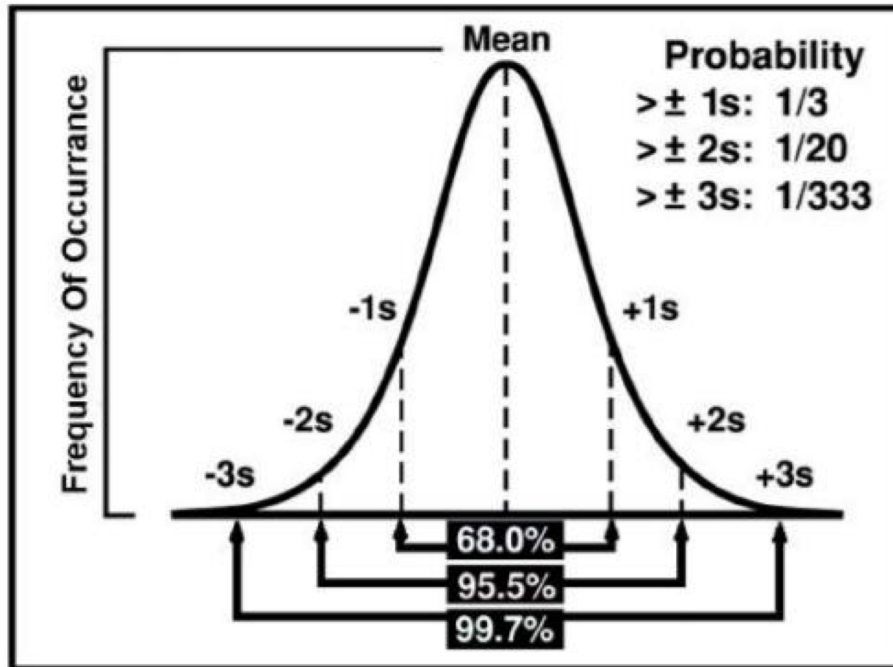


CQ INTERNO - garantisce che le procedure di misurazione soddisfino le specifiche previste nel sistema qualità al momento del test sul paziente → controlli positivi (artificiali o non) inseriti in corse analitiche routinarie e sottoposti a ciclo analitico rigorosamente identico a quello dei comuni campioni. La valutazione dei valori osservati rispetto i target attesi consente di verificare che la misura sia corretta attraverso una stima della **precisione** e **accuratezza** dei risultati. Applicato per ogni singolo analita.

VEQ (valutazione esterna di qualità, proficiency testing) – è basato su campioni concentrazione ignota inviati da un'istituzione esterna indipendente. I risultati del singolo laboratorio sono confrontati con quelli degli altri laboratori partecipanti al programma per verificare il grado di concordanza tra i risultati dichiarati fra i diversi laboratori e il grado di coincidenza fra le misure osservate e quelle previste , nel caso si sia accertata questa grandezza con un metodo analitico di rango superiore.

CQ INTERNO – si basa sull'assunto che la distribuzione dei risultati ottenuti da un campione con un determinato metodo analitico mostri una distribuzione Gaussiana, in cui moda, media e mediana coincidono.

- $\pm 1s$ – 68.0%
- $\pm 2s$ – 95.5%
- $\pm 3s$ – 99.7%



Distanza fra milite superiore e inferiore della distribuzione normale = $6s$.

Range di distribuzione normale è uguale a $\mu \pm 3s$

La distanza di ogni singolo punto dell'area dal centro viene definita Z score che è:

$$z \text{ score} = \frac{x_i - \mu}{s}$$

CQI VALUTAZIONE CONTINUA DEL LAVORO DI LABORATORIO

CQ INTERNO – APPLICAZIONE PRATICA

2 o più campioni di controllo almeno una volta al giorno prima o nel corso del run analitico.

Se almeno una delle misure fatte è al di fuori di uno dei due limiti di controllo, possono esser richieste azioni affinché gli errori casuali o sistematici siano sotto controllo.

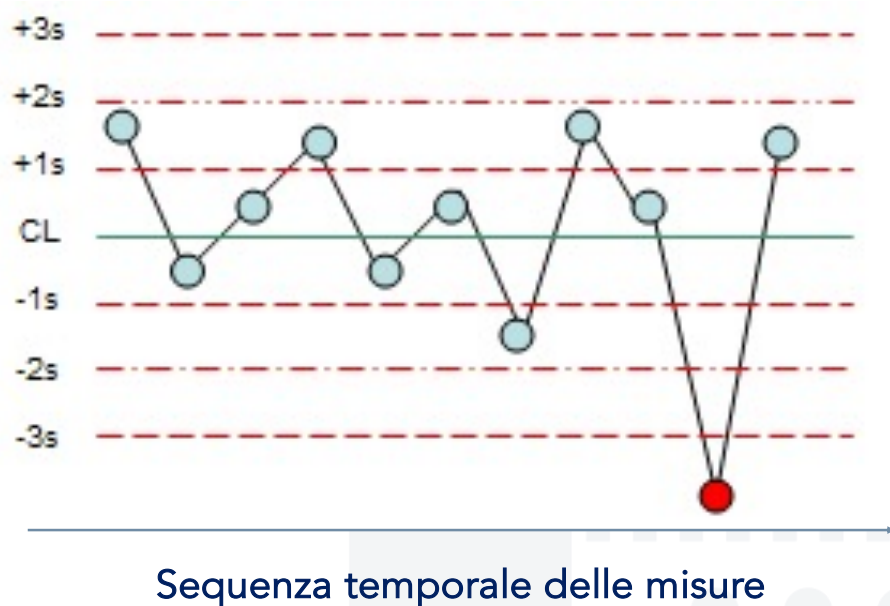
COME DEFINIRE I LIMITI DI CONTROLLO

1. Si raccolgono 20-30 misurazioni dei controlli in giorni differenti
2. Si calcola μ e s e si considera il range $\mu \pm 3s$ come limite di prova
3. Si verifica se una qualsiasi delle misurazioni del controllo supera il range $\mu \pm 3s$. Se è così il valore anomalo viene rifiutato e media e deviazione vengono ricalcolati
4. Si ripete la procedura in 3 fino a quando nessuna misurazione supera il range $\mu \pm 3s$. A questo punto si accettano come riferimento del CQ la media e i limiti di controllo.
5. Questi sono i valori veri a cui far riferimento.

CQ INTERNO – CARTE DI LEVEY-JENNINGS

PER DESCRIVERE L'ANDAMENTO DELLA QUALITA' ANALITICA NEL LABORATORIO

È basata sul confronto dei dati giornalmente osservati con quelli rilevati inizialmente dai materiali di controllo.



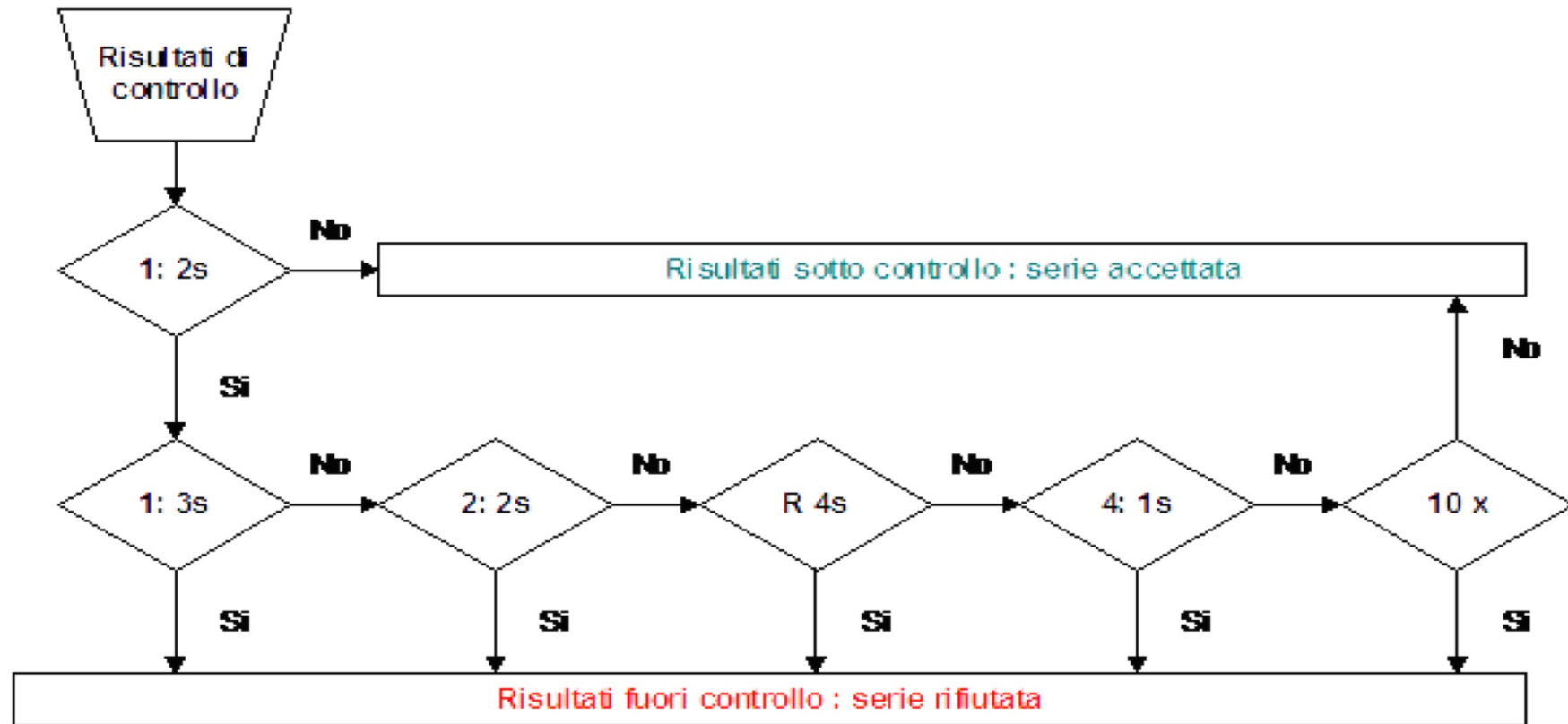
Dalla sequenza dei punti è evidente l'occorrenza di un evento fuori controllo, mentre la scoperta di errori sistemici è più complessa.


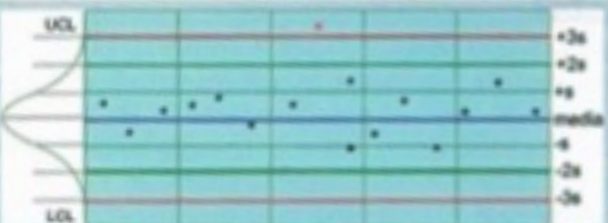
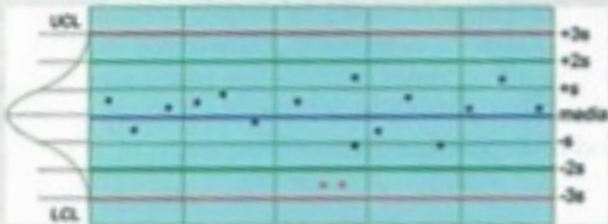
Il criterio più usato per interpretare anomalie nelle tabelle di Levey-Jennings è l'applicazione delle regole di Westgard

Di seguito flusso e le principali

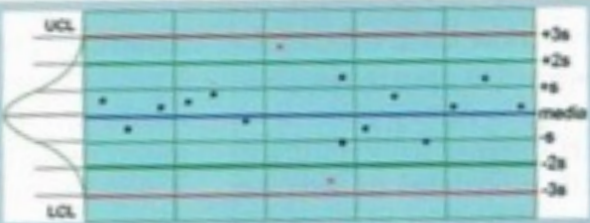
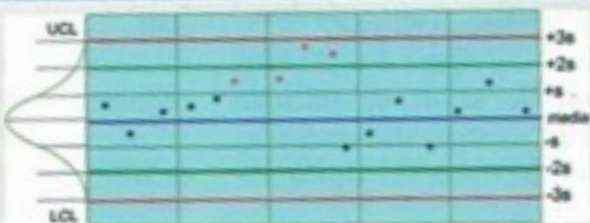
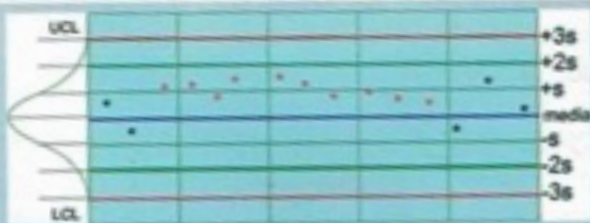
CQ INTERNO – REGOLE DI WESTGARD

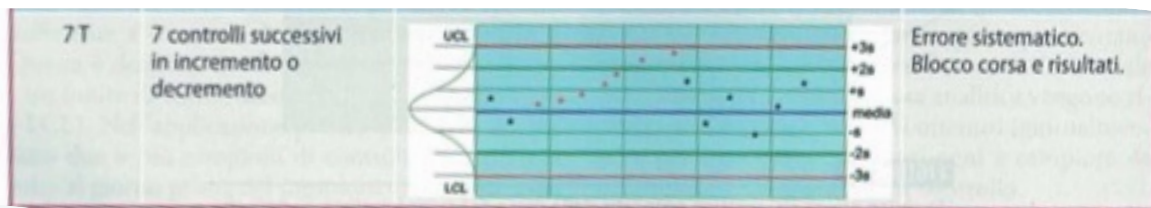
Sistema di regole multiple di Westgard



Simbolo	Descrizione	Aspetto plot Levey-Jennings	Decisione
1_{2s}	1 singolo controllo tra $\bar{x} + 2s$ o $\bar{x} + 3s$ o tra $\bar{x} - 2s$ o $\bar{x} - 3s$		Avvertimento, corsa valida.
1_{3s}	1 singolo controllo oltre $\bar{x} \pm 3s$		Probabile errore casuale. Blocco corsa e risultati.
2_{2s}	2 controlli successivi univocamente tra $\bar{x} \pm 2s$ e $\bar{x} \pm 3s$		Errore sistematico. Blocco corsa e risultati.



R_{45}	Distanza tra due controlli successivi $>4s$		Errori casuali. Blocco corsa e risultati.
4_{1s}	4 controlli successivi tra $\bar{x} + 1s$ e $\bar{x} + 3s$ o tra $\bar{x} - 1s$ e $\bar{x} - 3s$		Errore sistematico. Blocco corsa e risultati.
10 x	10 controlli successivi tra $\bar{x} + 1s$ e $\bar{x} + 3s$ o tra $\bar{x} - 1s$ e $\bar{x} - 3s$		Errore sistematico. Blocco corsa e risultati.



CQ INTERNO – METODI ALTERNATIVI

METODO DELLA MEDIA DEI NORMALI (AON):

Nel caso di rilevanti numeri di prestazioni la media dei valori dei campioni normali analizzati è relativamente costante (purchè sia invariata la popolazione servita). Si calcola μ e s per avere gli intervalli di confidenza. Eseguendo giornalmente il calcolo dei parametri di distribuzione sullo stesso numero di campioni normali per cui è stata richiesta l'analisi, è possibile evidenziare eventuali spostamenti dei valori e quando la AON eccede i limiti di controllo, si può ipotizzare un errore sistemico.

Contro: Tale metodo non consente di evidenziare errori casuali

Pro: minimo costo, no campioni speciali, no consumo reagenti extra.

METODO DEL DELTA CHECK

Utilizza valori longitudinali del singolo paziente. Consente un discreto livello di controllo e informazioni sulla situazione del paziente. Delta Check è la differenza tra un valore osservato in un soggetto e il valore precedentemente misurato:

$$\text{Delta Check \%} = \frac{(\text{valore attuale} - \text{valore precedente}) * 100}{\text{Valore precedente}}$$

CQ INTERNO – METODI ALTERNATIVI

METODO DEL DELTA CHECK

È influenzato dallo stato di salute del paziente, dalla variabilità intra-individuale, da quella pre-analitica, dalla distanza temporale fra i due dati.

Formula per valutarli: $Cv_{tot} = \sqrt{CV_i^2 + CV_a^2 + CV_p^2}$

Dove CV_i è la variabilità intra-individuale, CV_a quella analitica e CV_p la prer-analitica

Per la chimica clinica automatizzata situazioni fuori controllo potrebbero essere evidenziate da CV = ±60% per N ureico, CV = ±5% per Na⁺, CV = ±50% per la creatinina rispetto un prelievo fatto 48h prima.

Sensibilità limitata, evidenzia situazioni di fuori controllo grossolane.

CARTE CUSUM (Cumulative Sum)

Risolve il problema della bassa numerosità dei campioni di controllo in quanto valuta gli scostamenti dai valori centrali.

Con monitoraggio della media μ , la formula più semplice di carta CUSUM è quella basata sulla grandezza S_i per una serie di controlli x_1, x_2, \dots, x_i

$S_i = \sum_i (\bar{x}_i - \mu_0)$ con μ_0 il parametro medio dell'analita sotto controllo

In condizioni di controllo la somma delle S_i tende a 0, se è positiva si presenterà un trend verso l'alto

CQ INTERNO – METODI ALTERNATIVI

CARTE CUSUM (Cumulative Sum)

Criticità: determinazione di μ_0

Un forte shift potrebbe non esser riconosciuto immediatamente per effetto della sommatoria estesa tamponata dai dati precedenti

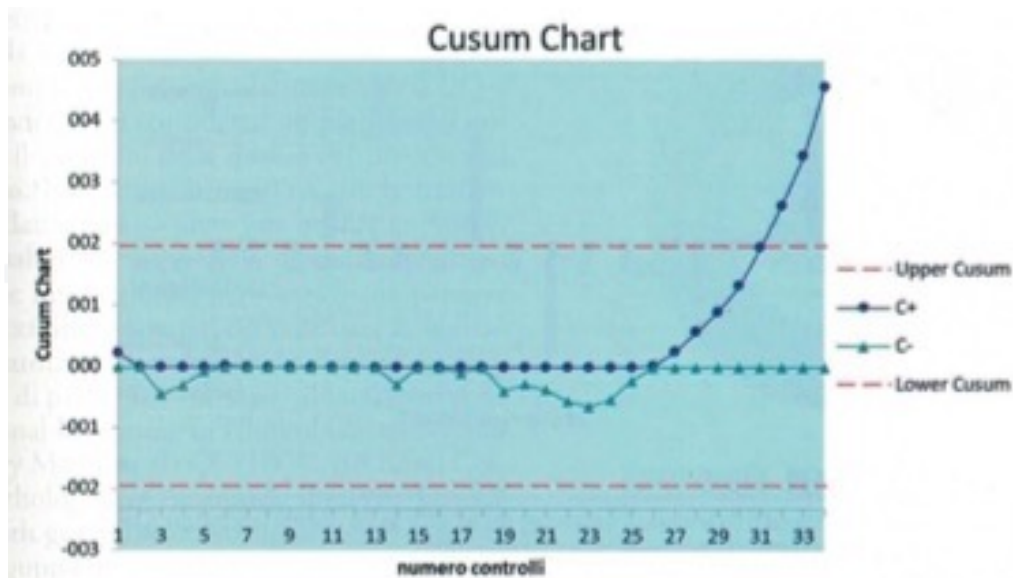


FIGURA 2.10

Una carta CUSUM per il controllo di qualità della Calcemia. L'andamento della curva dimostra che una variazione del parametro è iniziata intorno alla corsa n. 24, quindi molto prima di quanto sarebbe stato evidente con la classica carta di Levey-Jennings.

CONTROLLO DI QUALITA` ESTERNO

Organizzazione esterna

Inerzia nella correzione delle non conformità

Molto utile per analiti non routinari, specie nella fase di messa a punto della metodica

In alcuni paesi è obbligatorio per ottenere l'accreditamento (Proficiency testing)

Un forte shift potrebbe non esser riconosciuto immediatamente per effetto della sommatoria estesa tamponata dai dati precedenti

L' EFFICACIA dei programmi di VEQ si evidenzia soprattutto nel caso di prestazioni insoddisfacenti ? il lab è stimolato ad individuare le possibili cause e a porre in atto eventuali azioni correttive

Partecipare al VEQ fa parte delle GLP

Rappresenta un continuo miglioramento nella concordanza dei dati tra lab diversi per ottenere un risultato analogo

Controllo di Qualità Esterno

Adesione al programma di VEQ

Ricevimento e analisi con le stesse modalità utilizzate per i campioni dei pazienti

Invio dei risultati/interpretazione/referto al centro che gestisce il programma

Elaborazione dei risultati ricevuti dai vari lab, report al singolo lab con valutazione del dato e correlazioni relative ai metodi/sistemi diagnostici utilizzati



CONTROLLO DI QUALITA` ESTERNO

Organizzazione esterna

Inerzia nella correzione delle non conformità

Molto utile per analiti non routinari, specie nella fase di messa a punto della metodica

In alcuni paesi è obbligatorio per ottenere l'accreditamento (Proficiency testing)

L'EFFICACIA dei programmi di VEQ si evidenzia soprattutto nel caso di prestazioni insoddisfacenti: il lab è stimolato ad individuare le possibili cause e a porre in atto eventuali azioni correttive

Partecipare al VEQ fa parte delle GLP

Rappresenta un continuo miglioramento nella concordanza dei dati tra lab diversi per ottenere un risultato analogo

Parametri valutati sono espressi generalmente come media \pm 2SD

Viene generalmente plottato l'indice di deviazione standard

$$SDI = \frac{\text{Risultato osservato} - \text{Valore medio del gruppo dei pari}}{\text{Deviazione standard del gruppo dei pari}}$$

CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO

I risultati vengono espressi in grafici

The scoring system is based on deviation from the assigned value.

1. For the Extracted FFPE RNA 260/280 ratio, the scoring system is the following:

Deviation from assigned value (z-score)	Consensus Score
< 1 standard deviation	0
≤ 2 standard deviation	1
> 2 standard deviation	2
> 3 standard deviation	3

2. For the Extracted FFPE RNA yield and for the Extracted FFPE RNA integrity, the scoring system is the following:

Deviation from assigned value (z-score)	Consensus Score
< -3 standard deviation	3
< -2 standard deviation	2
< -1 standard deviation	1
> -1 and < +1 standard deviation	0
> +1 standard deviation	0

This scoring system highlights the proficiency of Participants to obtain higher yield and integrity than the consensus mean.

3. For the Extracted mRNA Quality Index, the scoring system is the following:

Deviation from assigned value (z-score)	Consensus Score
< -1 standard deviation	0
> -1 and < +1 standard deviation	0
> +1 standard deviation	1
> +2 standard deviation	2
> +3 standard deviation	3

This scoring system highlights the proficiency of Participants to obtain lower ΔCt values, meaning higher quality of mRNA than the consensus mean.

Extracted FFPE RNA Yield per Section

YOU SUBMITTED RESULTS WITH THIS METHOD

Expected Results

Panel Composition and expected result (mean values and participant data standard deviations)

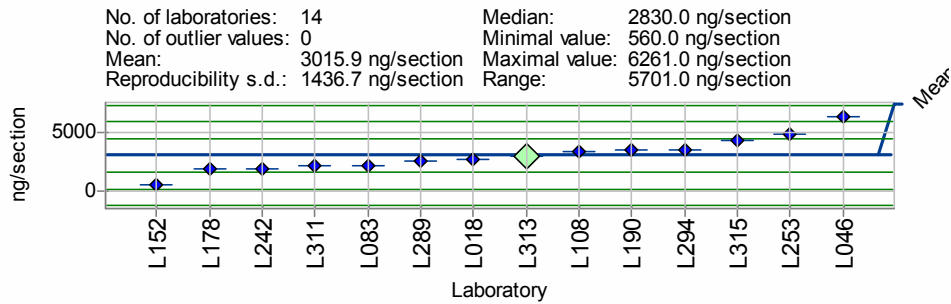
Sample	Sample content	Mean (ng/section)	Proficiency testing standard deviation (ng/section)
All Results	RNA	3015.9	1436.7
Magnetic bead-based	RNA	2635.8	914.7
Silica membrane-based	RNA	3167.9	1616.4

Your Results

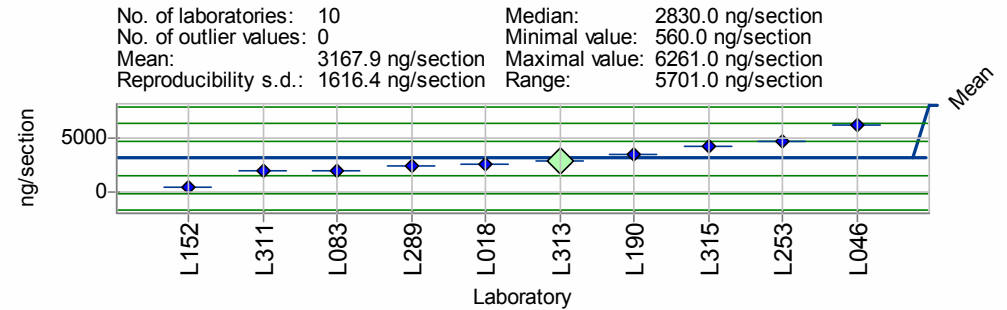
Sample	Sample content	Your result (ng/section)	Your consensus score
All Results	RNA	2992.0	0
Magnetic bead-based	RNA		
Silica membrane-based	RNA	2992.0	0
Sum quantitative panel score			0

CONTROLLO DI QUALITA' ESTERNO

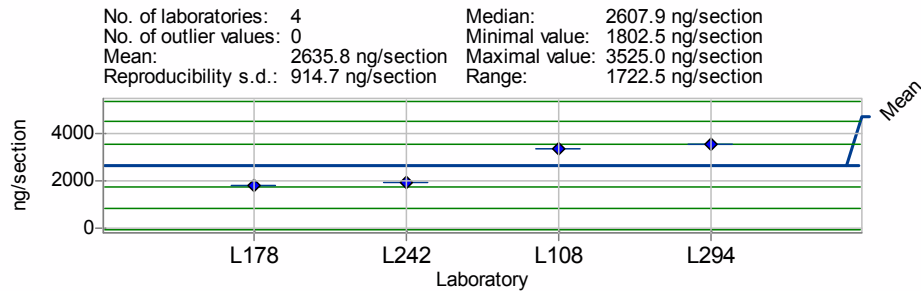
All Results



Silica membrane-based Results

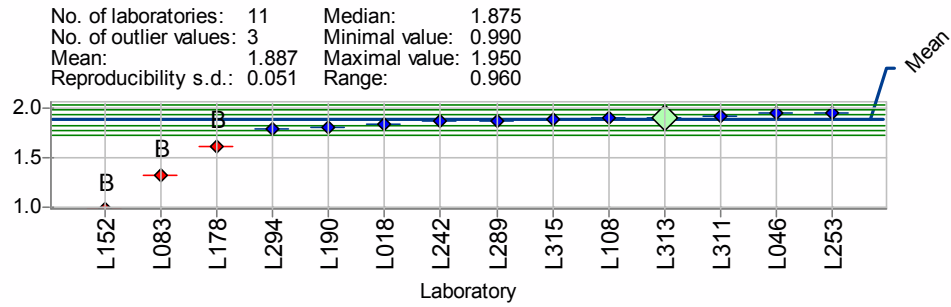


Magnetic bead-based Results

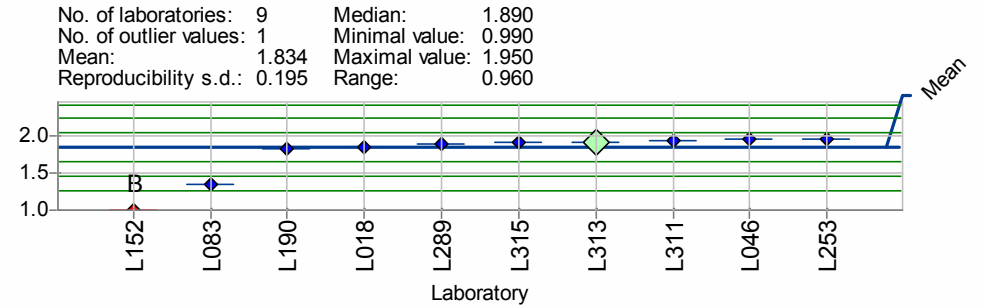


CONTROLLO DI QUALITA' ESTERNO

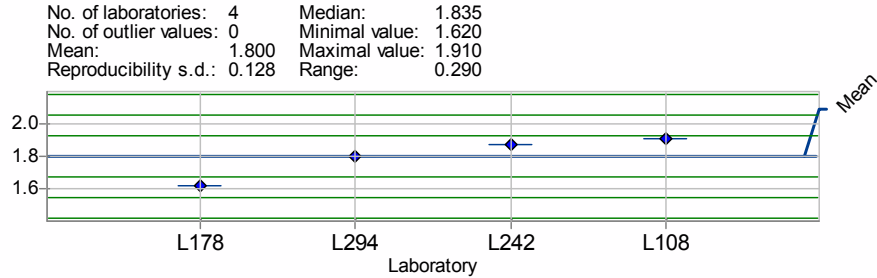
All Results



Silica membrane-based Results

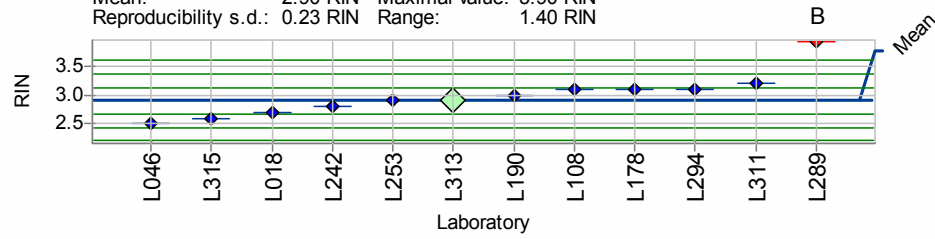


Magnetic bead-based Results



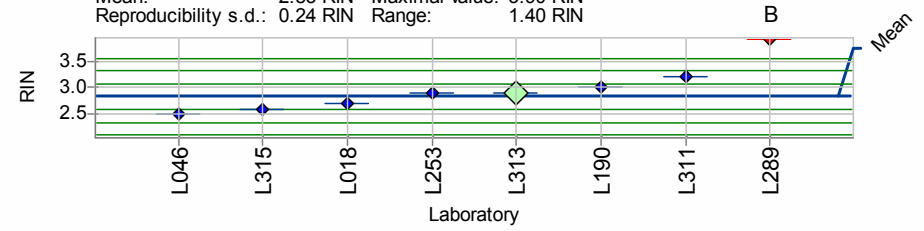
All Results

No. of laboratories: 11 Median: 2.95 RIN
 No. of outlier values: 1 Minimal value: 2.50 RIN
 Mean: 2.90 RIN Maximal value: 3.90 RIN
 Reproducibility s.d.: 0.23 RIN Range: 1.40 RIN



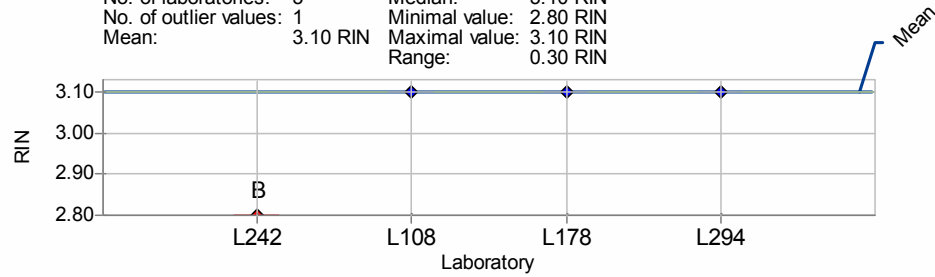
Silica membrane-based Results

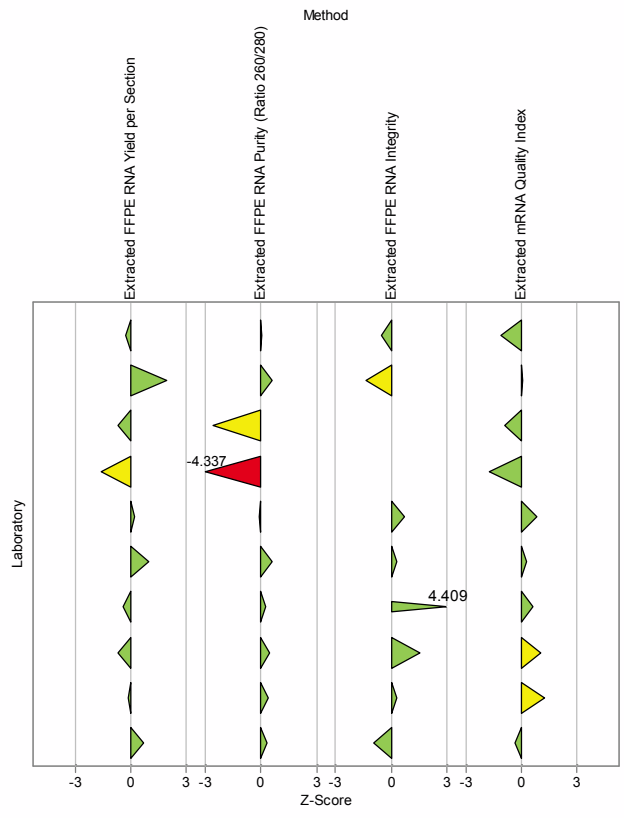
No. of laboratories: 7 Median: 2.90 RIN
 No. of outlier values: 1 Minimal value: 2.50 RIN
 Mean: 2.83 RIN Maximal value: 3.90 RIN
 Reproducibility s.d.: 0.24 RIN Range: 1.40 RIN



Magnetic bead-based Results

No. of laboratories: 3 Median: 3.10 RIN
 No. of outlier values: 1 Minimal value: 2.80 RIN
 Mean: 3.10 RIN Maximal value: 3.10 RIN
 Range: 0.30 RIN







**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE**

SERENA BONIN

Dipartimento di Scienze Mediche,
Chirurgiche e della Salute

sbonin@units.it

www.units.it