

**Possibili azioni correttive in caso di
prestazione insufficiente in prove
VEQ di Programmi EQA**

Annalisa Kunkl

U.O.S di Diagnostica Citofluorimetrica

S.C. Anatomia Patologica Ospedaliera

**Azienda Ospedaliera Universitaria "San Martino"
Genova**

SISTEMA QUALITA'

QUALITA' DEI DATI

CQ intra lab



EQA = ESTERNAL QUALITY ASSESSMENT



Valutazione Esterna della Qualità: VEQ o EQA ?

- **EQA:**

- Proposto esclusivamente da organizzazioni scientifiche riconosciute e accreditate da Enti Certificatori in Sanità (es: JCAHO...)

- **EQA:**

- Valuta globalmente il sistema di analisi
- Offre indicazioni per una eventuale modifica delle procedure
- Permette di partecipare a trial clinici controllati
- Ruolo Educazionale

RUOLO EDUCAZIONALE del Programma EQA

- **Stabilire un indicatore di livello di prestazione**
 - Meccanismo per richiamare l'attenzione degli operatori
 - Assistere i laboratori ad identificare eventuali problemi nelle analisi dei campioni
 - Monitorare l'efficacia dei cambiamenti implementati
 - Valutare il personale addetto
- **Scopo educativo, non punitivo:**
 - Migliorare le prestazioni del singolo laboratorio

VALUTAZIONE

Il Laboratorio iscritto è
chiamato ad una valutazione

ANALISI DEI CAMPIONI

- **Test su campioni ematici a valore ignoto:**
 - 3 campioni in 3 prove/anno (REGOLARE)
 - I campioni coprono la gamma di positività riscontrata nei campioni di routine (VARIABILE)
- **I campioni dovrebbero essere esaminati:**
 - Da personale normalmente addetto
 - Insieme alla regolare mole di lavoro
 - Usando i metodi di routine del laboratorio
 - Lo stesso numero di volte
- **Il laboratorio deve:**

Punteggi di valutazione per singoli dati

- **Punteggio 2**
 - Residuo accettabile
- **Punteggio 1**
 - Residuo inaccettabile, deviata $< |2|$
- **Punteggio 0**
 - Residuo inaccettabile, deviata $> |2|$

Livello di prestazione

- **soddisfacente:**
 - 80% dati accettabili con punteggio 1 + 2 su 9 campioni
- **eccellente:**
 - 80% dati accettabili con punteggio 2 su 9 campioni

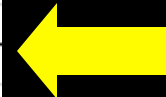
Valutazione di Singoli Campioni

Esempio pratico

1. Calcolo la mediana dei dati di tutti i lab per ogni parametro



| Camp 2 | Mediana | Residuo accettabile |
|------------------------------|---------|---------------------|
| GB N°/mm ³ | 4330 | 379 |
| % linfociti | 36.2 | 4.2 |
| Linfociti N°/mm ² | 1508 | 212 |
| % CD3+ | 67.5 | 2.8 |
| % CD4+CD3+ | 9.5 | 1.4 |
| % CD8+CD3+ | 53.5 | 3.3 |
| % B | 7.0 | 1.6 |
| % NK | 22.0 | 3.2 |
| N°/mm ² CD3+ | 1084 | 129 |
| N°/mm ² CD4+CD3+ | 143 | 26 |
| N°/mm ² CD8+CD3+ | 840 | 104 |
| N°/mm ² B | 108 | 42 |
| N°/mm ² NK | 312 | 88 |



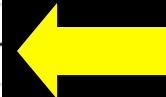
2. Uso le equazioni per stabilire i limiti del residuo per ogni parametro

Esempio pratico

1. Calcolo la mediana dei dati di tutti i lab per ogni parametro



| Camp 2 | Mediana | Residuo accettabile |
|------------------------------|---------|---------------------|
| GB N°/mm ³ | 4330 | 379 |
| % linfociti | 36.2 | 4.2 |
| Linfociti N°/mm ² | 1508 | 212 |
| % CD3+ | 67.5 | 2.8 |
| % CD4+CD3+ | 9.5 | 1.4 |
| % CD8+CD3+ | 53.5 | 3.3 |
| % B | 7.0 | 1.6 |
| % NK | 22.0 | 3.2 |
| N°/mm ² CD3+ | 1084 | 129 |
| N°/mm ² CD4+CD3+ | 143 | 26 |
| N°/mm ² CD8+CD3+ | 840 | 104 |
| N°/mm ² B | 108 | 42 |
| N°/mm ² NK | 312 | 88 |



2. Uso le equazioni per stabilire i limiti del residuo per ogni parametro

3. Calcolo il residuo = differenza tra il dato del lab e la mediana di tutti i dati

4. Se il residuo e' accettabile

2

| Camp2 | Riportati | Mediana | Residuo | IQR mod | Deviata | Punteggio |
|------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| GB N°/mm³ | 4020 | 4330 | -310 | 308 | | 2 |
| % linfociti | 37.5 | 36.2 | 1.3 | 2.5 | | 2 |
| Linfociti N°/mm3 | 1508 | 1508 | 0 | 138 | | 2 |
| % CD3+ | 63.0 | 67.5 | -4.5 | 1.9 | -2.4 | 0 |
| % CD4+CD3+ | 9.0 | 9.5 | -0.5 | 0.8 | | 2 |
| % CD8+CD3+ | 45.0 | 53.5 | -8.5 | 3.4 | -2.5 | 0 |
| % B | 7.0 | 7.0 | 0.0 | 2.3 | | 2 |
| % NK | 23.0 | 22.0 | 1.0 | 3.9 | | 2 |
| N°/mm³ CD3+ | 950 | 1084 | -134 | 138 | -1.0 | 1 |
| N°/mm³ CD4+CD3+ | 136 | 143 | -7 | 34 | | 2 |
| N°/mm³ CD8+CD3+ | 678 | 840 | -162 | 95 | -1.7 | 1 |
| N°/mm³ B | 106 | 108 | -2 | 33 | | 2 |
| N°/mm³ NK | 347 | 312 | 35 | 62 | | 2 |

5. Se il residuo e' inaccettabile lo divido per IQR mod (res/IQRmod=deviata)

deviata < |2|

1

deviata > |2|

0

Valutazione dei 3 campioni di una prova

| VALORI PERCENTUALI | Camp 1 | Camp 2 | Camp 3 |
|--------------------|--------|--------|--------|
| CD3+ | 1 | 0 | 2 |
| CD4+ | 2 | 2 | 2 |
| CD8+ | 0 | 0 | 2 |
| B | 2 | 2 | 2 |
| NK | 2 | 2 | 2 |
| Punteggio ottenuto | 7 | 6 | 10 |
| Punteggio atteso | 10 | 10 | 10 |

| DATI EMATOLOGICI | Camp 1 | Camp 2 | Camp 3 |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| GB N/mm ³ | 2 | 2 | 2 |
| % linfociti | 2 | 2 | 2 |
| Linfociti N/mm ³ | 2 | 2 | 2 |
| Punteggio ottenuto | 6 | 6 | 6 |
| Punteggio atteso | 6 | 6 | 6 |

| VALORI ASSOLUTI | Camp 1 | Camp 2 | Camp 3 |
|--------------------|--------|--------|--------|
| CD3+ | 2 | 1 | 2 |
| CD4+ | 2 | 2 | 2 |
| CD8+ | 0 | 1 | 2 |
| B | 2 | 2 | 2 |
| NK | 2 | 2 | 2 |
| Punteggio ottenuto | 8 | 8 | 10 |
| Punteggio atteso | 10 | 10 | 10 |

Il fallimento e' sui CD3+, sottopopolazione CD8+, nei campioni 1 e 2

I valori assoluti dei CD3+ rientrano, ma non i valori assoluti dei CD8+

L'errore su %CD8+ era cosi' ampio che non si e' compensato con dati ematologici OK

Conclusioni diverse da risultati diversi

Lab x

| VALORI PERCENTUALI | Camp 1 | Camp 2 | Camp 3 |
|--------------------|--------|--------|--------|
| CD3+ | 1 | 2 | 0 |
| CD4+ | 2 | 2 | 0 |
| CD8+ | 2 | 2 | 2 |
| B | 2 | 2 | 2 |
| NK | 2 | 2 | 1 |
| Punteggio ottenuto | 9 | 10 | 5 |
| Punteggio atteso | 10 | 10 | 10 |

Singolo campione
ceffato

Lab y

| VALORI PERCENTUALI | Camp 1 | Camp 2 | Camp 3 |
|--------------------|--------|--------|--------|
| CD3+ | 0 | 2 | 2 |
| CD4+ | 2 | 0 | 0 |
| CD8+ | 2 | 2 | 2 |
| B | 2 | 1 | 0 |
| NK | 0 | 0 | 0 |
| Punteggio ottenuto | 6 | 5 | 4 |
| Punteggio atteso | 10 | 10 | 10 |

Vari parametri falliti su
piu' campioni

Lab z

| VALORI PERCENTUALI | Camp 1 | Camp 2 | Camp 3 |
|--------------------|--------|--------|--------|
| CD3+ | 2 | 0 | 2 |
| CD4+ | 2 | 0 | 2 |
| CD8+ | 2 | 1 | 2 |
| B | 2 | 2 | 2 |
| NK | 2 | 1 | 2 |
| Punteggio ottenuto | 10 | 4 | 10 |
| Punteggio atteso | 10 | 10 | 10 |

Singolo campione
ceffato

Punteggi su più campioni

Il livello di prestazione su piu' prove aiuta a valutare la gravita' della situazione

Livello di prestazione (dati 1999- 2001)*:

| EMATOLOGIA | N° dati riportati | % dati accettabili | |
|---|-------------------|--------------------|-------------|
| | | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| GB N/mm3 | 24 | 96 | 83 |
| Linfociti % | 24 | 63 | 58 |
| Linfociti N/mm3 | 24 | 71 | 54 |
| CITOMETRIA: (%) | | | |
| | N° dati riportati | % dati accettabili | |
| | | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| Linfociti T CD3+ | 24 | 96 | 83 |
| Linfociti T CD4+ | 24 | 92 | 79 |
| Linfociti T CD8+ | 24 | 96 | 83 |
| Linfociti B | 24 | 100 | 92 |
| Linfociti NK | 23 | 83 | 35 |
| CITOMETRIA + EMATOLOGIA (N°/mm3) | | | |
| | N° dati riportati | % dati accettabili | |
| | | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| Linfociti T CD3+ | 24 | 79 | 58 |
| Linfociti T CD4+ | 24 | 75 | 58 |
| Linfociti T CD8+ | 24 | 71 | 46 |
| Linfociti B | 24 | 100 | 92 |
| Linfociti NK | 23 | 96 | 57 |

insufficiente

Questo Lab si dovrebbe seriamente preoccupare del proprio analizzatore ematologico1

Obiettivo: Raggiungere l'eccellenza

Livello di prestazione (dati 1999- 2001):

| | | % dati accettabili | |
|---|-------------------|--------------------|-------------|
| EMATOLOGIA | N° dati riportati | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| GB N/mm3 | 27 | 100 | 100 |
| Linfociti % | 27 | 93 | 93 |
| Linfociti N/mm3 | 27 | 85 | 81 |
| | | | |
| CITOMETRIA: (%) | N° dati riportati | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| Linfociti T CD3+ | 27 | 81 | 63 |
| Linfociti T CD4+ | 27 | 93 | 78 |
| Linfociti T CD8+ | 27 | 89 | 67 |
| Linfociti B | 27 | 93 | 89 |
| Linfociti NK | 27 | 100 | 93 |
| | | | |
| | | % dati accettabili | |
| CITOMETRIA + EMATOLOGIA (N°/mm3) | N° dati riportati | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| Linfociti T CD3+ | 27 | 93 | 78 |
| Linfociti T CD4+ | 27 | 96 | 74 |
| Linfociti T CD8+ | 27 | 93 | 85 |
| Linfociti B | 27 | 100 | 85 |
| Linfociti NK | 27 | 100 | 96 |

soddisfacente

Obiettivo: Valutare gli operatori

| Livello di prestazione (dati 1999-2001): | | | |
|--|-------------------|--------------------|--------------|
| | | % dati accettabili | |
| | N° dati riportati | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| | op 39 (op40) | op 39 (op40) | op 39 (op40) |
| EMATOLOGIA | | | |
| GB N/mm3 | 21(3) | 100(100) | 86(100) |
| Linfociti % | 21(3) | 90(100) | 90(100) |
| Linfociti N/mm3 | 21(3) | 90(100) | 86(100) |
| | | | |
| | | % dati accettabili | |
| | N° dati riportati | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| | op 39 (op40) | op 39 (op40) | op 39 (op40) |
| CITOMETRIA: (%) | | | |
| Linfociti T CD3+ | 21(24) | 100(96) | 100(92) |
| Linfociti T CD4+ | 21(24) | 100(100) | 100(96) |
| Linfociti T CD8+ | 21(24) | 90(88) | 71(83) |
| Linfociti B | 21(24) | 100(96) | 95(92) |
| Linfociti NK | 21(24) | 95(100) | 90(100) |
| | | | |
| | | % dati accettabili | |
| | N° dati riportati | punteggio 1+2 | punteggio 2 |
| | op 39 (op40) | op 39 (op40) | op 39 (op40) |
| CITOMETRIA + EMATOLOGIA (N°/mm3) | | | |
| Linfociti T CD3+ | 21(24) | 95(96) | 62(75) |
| Linfociti T CD4+ | 21(24) | 100(100) | 90(96) |
| Linfociti T CD8+ | 21(24) | 90(92) | 86(92) |
| Linfociti B | 21(24) | 100(100) | 100(100) |
| Linfociti NK | 21(24) | 95(100) | 90(100) |

Tutti gli operatori del Lab sono meno bravi sui CD8+: problema specifico sui CD8+

!

ATTENZIONE

PRESTAZIONE INSUFFICIENTE

ASSISTENZA

ALL'INDIVIDUAZIONE DEL

Si riscontra solo nei campioni VEQ?
Quale è il reale scostamento?

Sì

Qualità del campione VEQ
E' un problema riscontrato da
altri?
Proprietà del campione VEQ

NO

Conte %

Conte assolute SP

Conte assolute DP

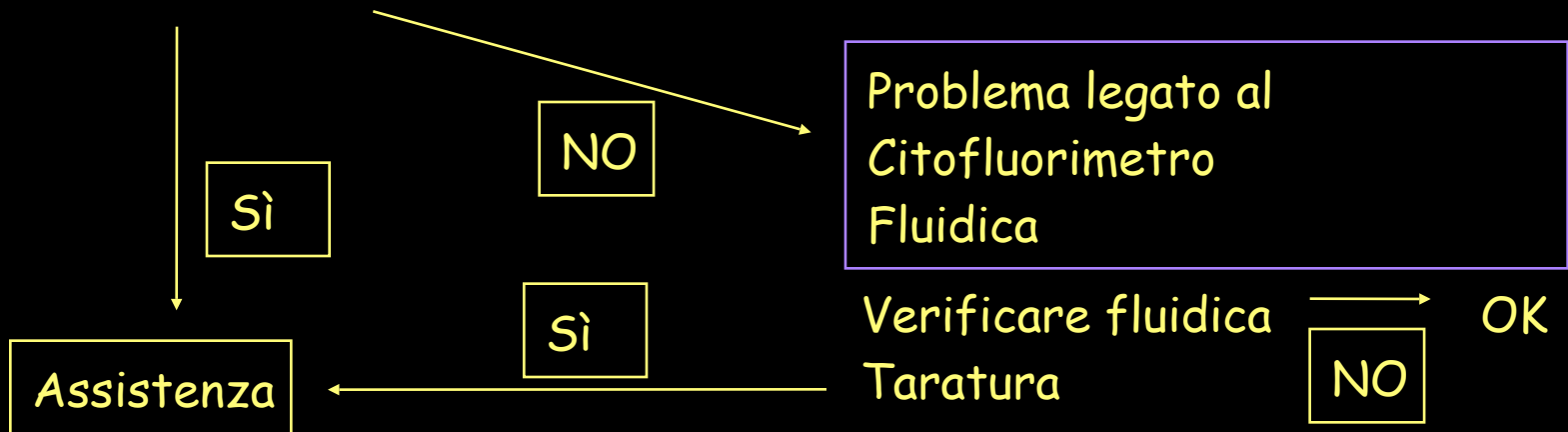
Riguarda solo qualche campione ogni tanto o esiste un trend?

A: Preparatore, Campionatore ed Analisi Automatica

Problema legato al Preparatore

Verificare ripetitività
Preparazione manuale con controlli

Problema legato ai reattivi e adesione
a
protocolli



B: Preparazione, Acquisizione, Analisi manuale

Preparazione manuale

mAb, reagenti

Tempo di lisi, quantità di lisante

STABILIRE DEI LIMITI ACCETTABILI DI VARIAZIONE TRA REPLICHE

CD4

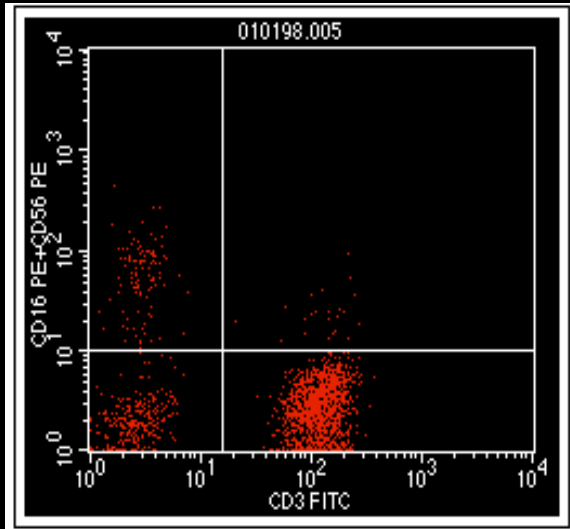
| | I test | | | | II test | | | | | |
|----------|------------------|------|------------|--|------------------|------|------------|--------------------|------------------------|-------|
| DATA | Ass linfociti | %CD4 | CD4 ass | | Ass linfociti | %CD4 | CD4 ass | Residuo trovato | Residuo accettabile | Esito |
| 19/07/04 | 1700 | 18 | 306 | | 1572 | 19 | 300 | 6 | 46 | OK |
| 19/07/04 | 807 | 20 | 161 | | 822 | 20 | 165 | 4 | 28 | OK |
| 07/10/04 | 851 | 44 | 372 | | 1025 | 47 | 480 | 108 | 55 | NO |

STABILIRE DEI LIMITI ACCETTABILI DI VARIAZIONE TRA CONTA LINFOCITI ASSOLUTI EMATOLOGICA E CITOMETRICA

| Data | N. Accett. | Conta linfociti ematologica (N./mm ³) | Conta linfociti citometrica (N./mm ³) | Residuo trovato | Residuo accettabile |
|----------|------------|---|---|--------------------|------------------------|
| 6/9/05 | 23655 | 912 | 790 | 122 | 190 |
| 7/9/05 | 23673 | 2488 | 2656 | 168 | 248 |
| 9/9/05 | 23710 | 2699 | 2342 | 357 | 256 |
| 12 09 05 | 23723 | 2071 | 1975 | 96 | 233 |
| 15/9/05 | 23781 | 2226 | 2377 | 151 | 239 |
| 22/9/05 | 23882 | 1845 | 1852 | 7 | 225 |
| 28/9/05 | 23928 | 1572 | 1638 | 66 | 215 |

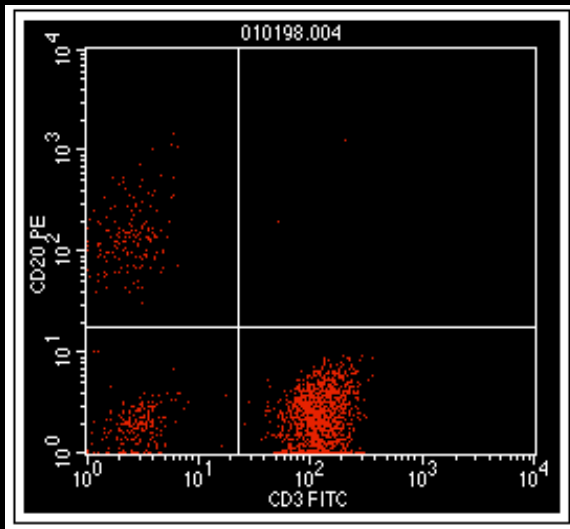
PROBLEMA RELATIVO ALLE
FREQUENZE RELATIVE (%)

CONTROLLO INTERNO: LINFOSOMMA



| % Gated |
|---------|
| 10.20 |
| 0.09 |
| 12.07 |
| 77.63 |

CD3+=78%



| % Gated |
|---------|
| 6.89 |
| 1.39 |
| 15.58 |
| 76.14 |

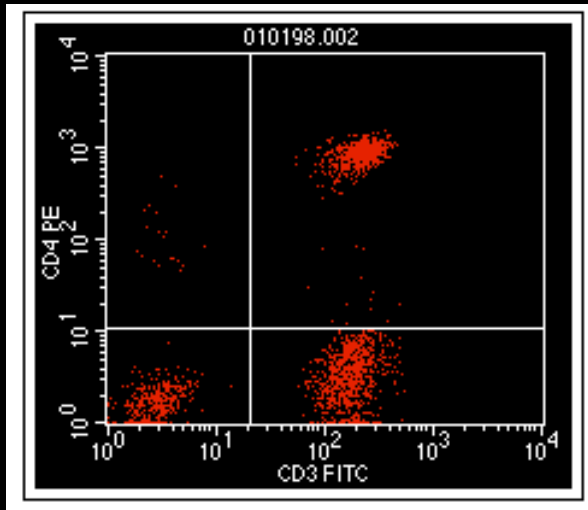
CD3+=77%

T + B+ NK=100% ± 5%

78% + 10% + 7% = 95%

78%,
77%,
79%,
80% = media 78%

CONTROLLO INTERNO: T SOMMA

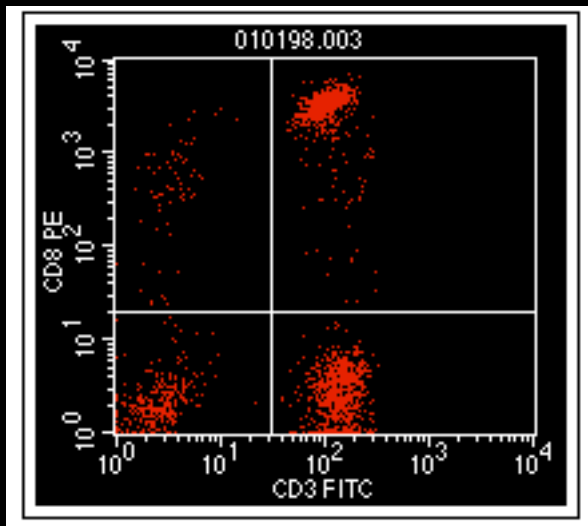


| % Gated |
|---------|
| 0.92 |
| 37.15 |
| 18.83 |
| 43.10 |

TCD4 + TCD8 = 0 < T CD3

37% + 37% = 74% < 80%

CD3+=80%

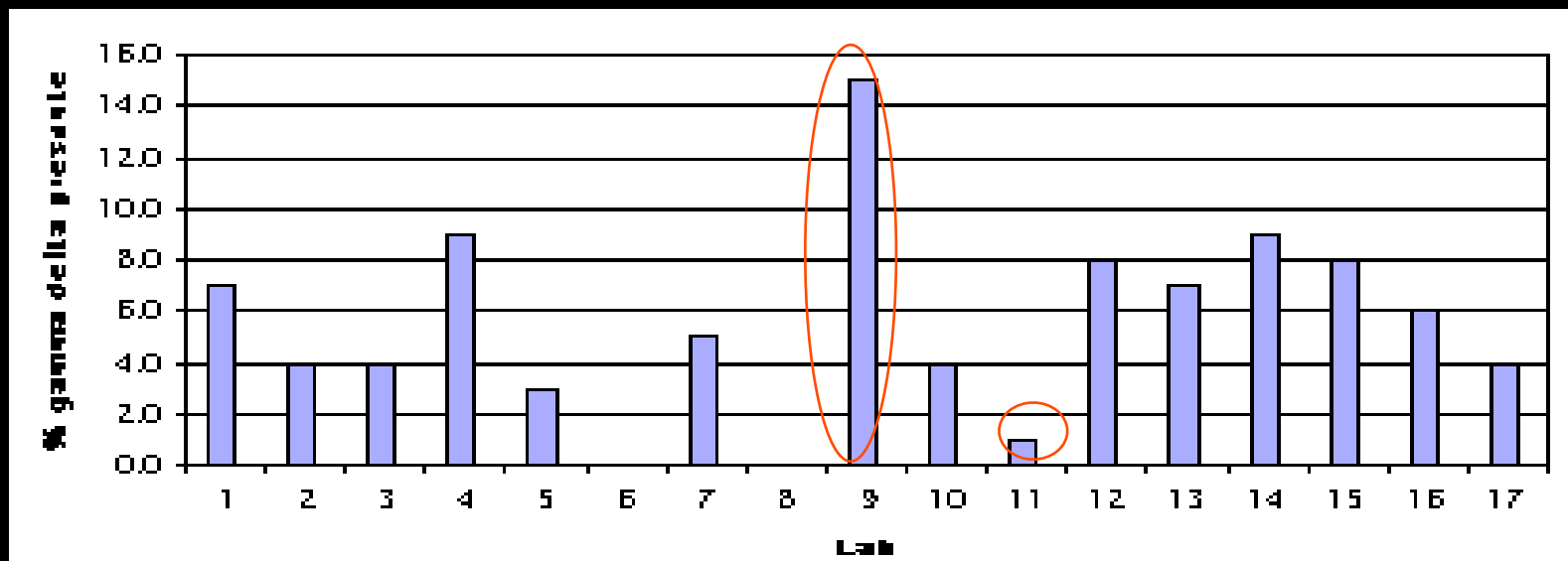


| % Gated |
|---------|
| 3.76 |
| 37.21 |
| 16.61 |
| 42.42 |

CD3+=79%

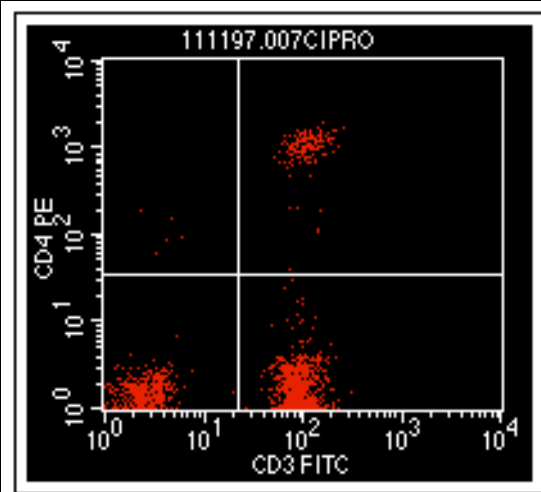
Valutazione dei controlli interni

| Camp2. Sangue intero di soggetto HIV+ | | | | | | | |
|---------------------------------------|----|----------|----------------------|----------------------|--------|-----------|---------------------------|
| LAB | OP | %PUREZZA | Linfosomma riportata | Linfosomma calcolata | % CD3+ | SOMMA% | |
| | | GATE | T+B+NK | T+B+NK | | TCD4+TCD8 | % $\gamma\delta$ presunte |
| | | 98 | 93 | 93 | 63 | 54 | 9.0 |
| | | 100 | 95 | 98 | 73 | 58 | 15.0 |



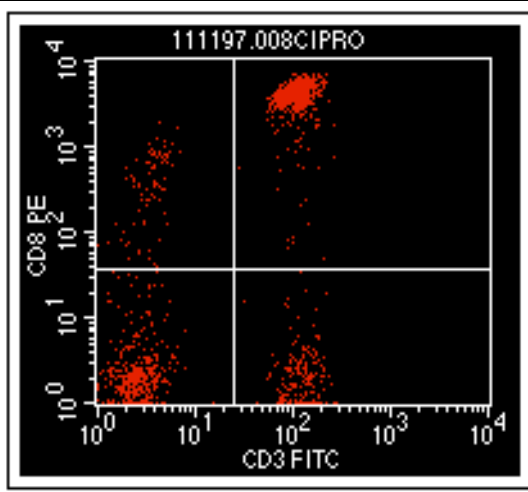
Aggregati !

Fuga dei CD8+ dal gate



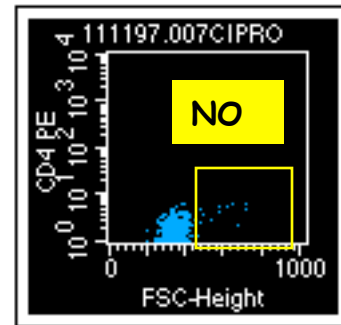
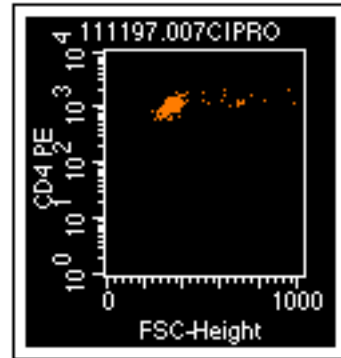
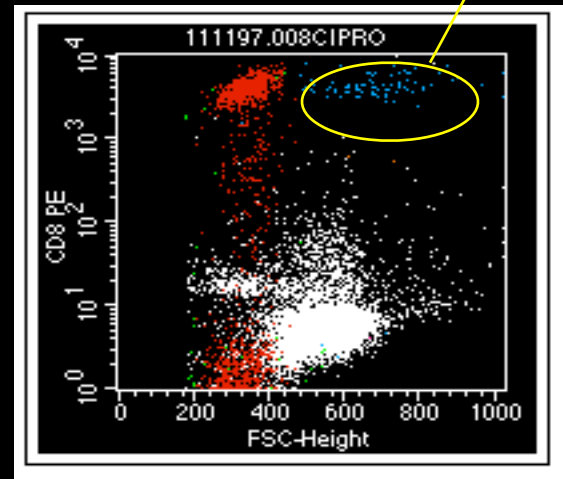
File: 111197.007CIPRO
Gated Events: 2664

| % Gated | |
|---------|--|
| 0.60 | |
| 11.00 | |
| 32.21 | |
| 56.19 | |



File: 111197.008CIPRO
Gated Events: 2742

| % Gated | |
|---------|--|
| 6.53 | |
| 51.42 | |
| 29.36 | |
| 12.69 | |



Manca il 5% di CD8+ !

FONTI DI VARIABILITA' ED ERRORE IN CITOMETRIA

TAPPE TEST

PROBLEMI POTENZIALI

Raccolta campioni

adeguata?, rappresentativa?

Trasporto
conservazione

vitalita', perdite selettive
aumentata autofluorescenza

Preparazione campione

aggregazione , perdite selettive

Colorazione

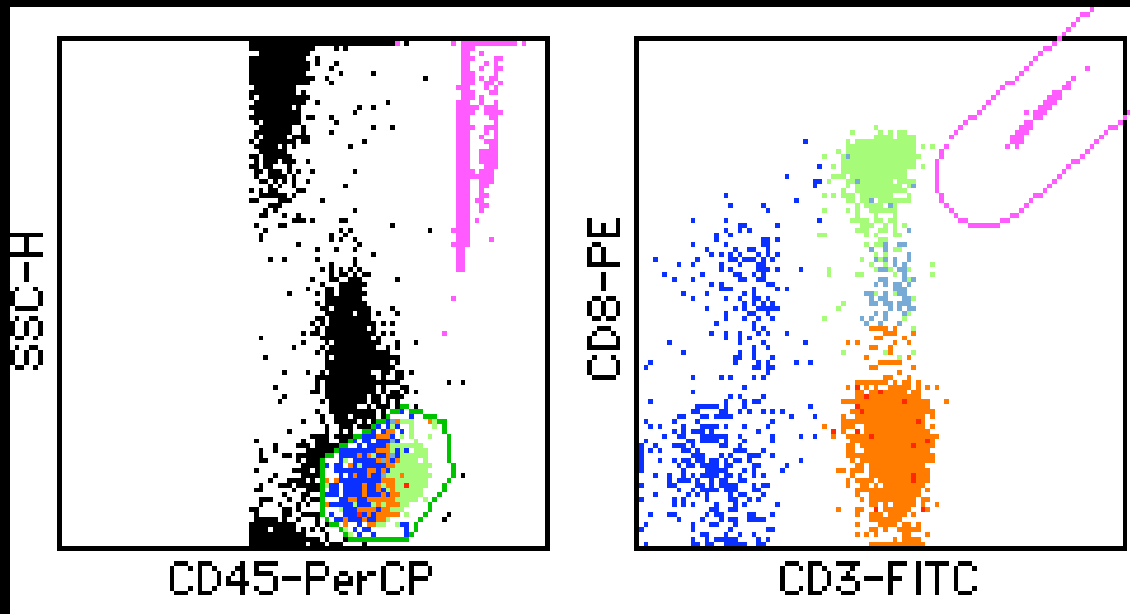
cross reattivita' , blocco ,
interferenza , saturazione, linearita'

Misure

strategie di gating

"GATING"

- principale elemento d'accuratezza dell'analisi citometrica
- gate errato = dati inaccurati

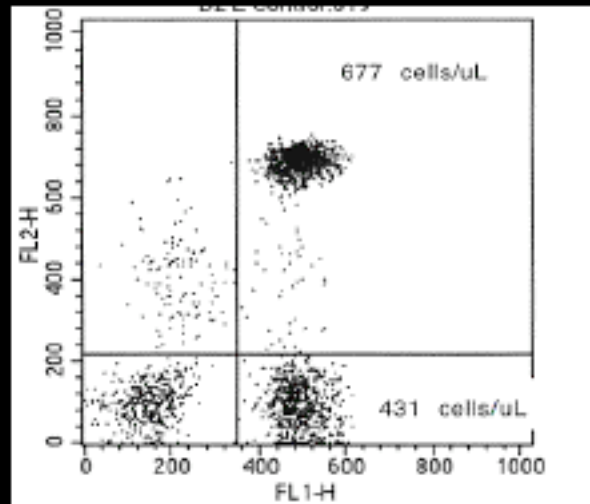
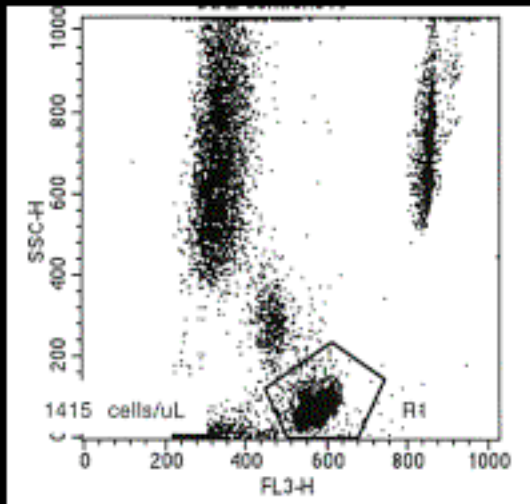


PROBLEMA RELATIVO ALLE CONTE ASSOLUTE (N/mm³)

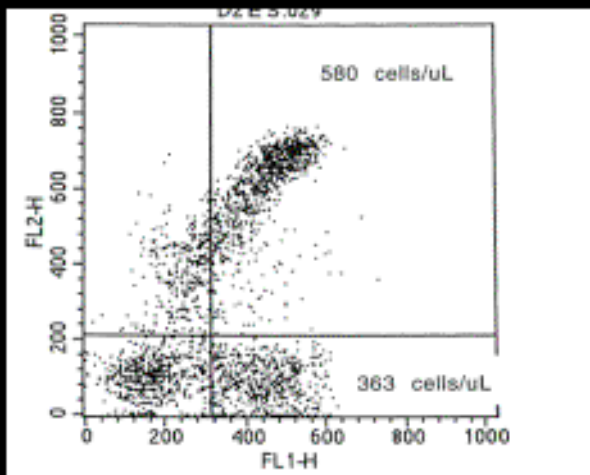
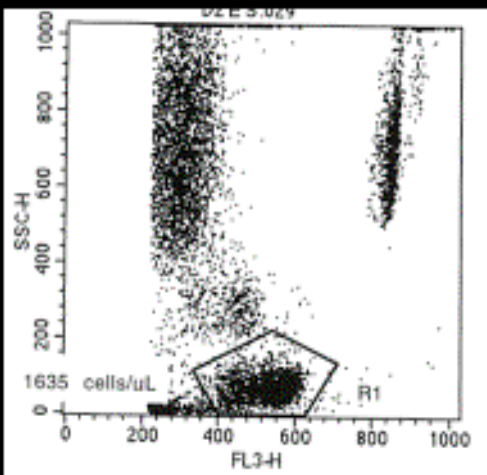
DOPPIA PIATTAFORMA
SINGOLA PIATTAFORMA

PROBLEMA RELATIVO ALLA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Problemi di vortex nel miscelare mAb e cellule



Vortex corretto



**Vortex
insufficiente**

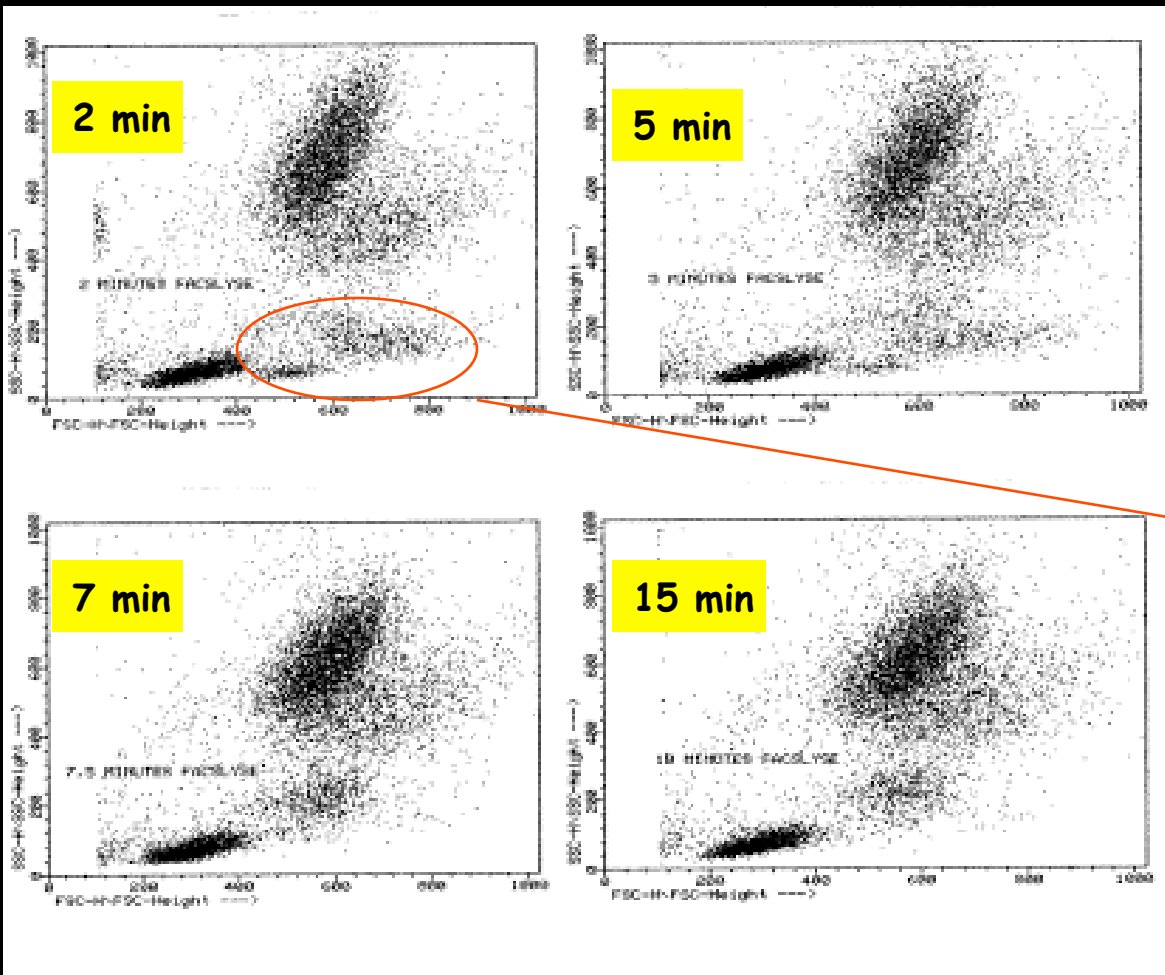
Cluster dei linfociti piu' diffuso, cattiva colorazione cellule doppio positive, conte errate

Problemi di lisi

Istruzioni disattese

Reagenti preparati non in modo corretto

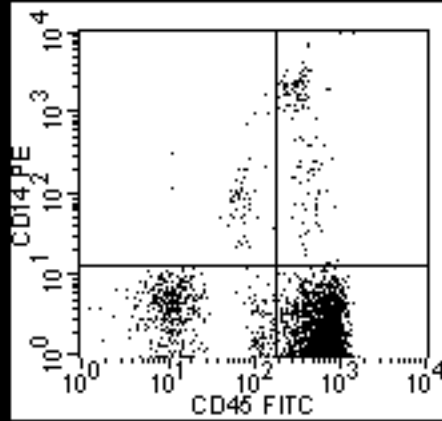
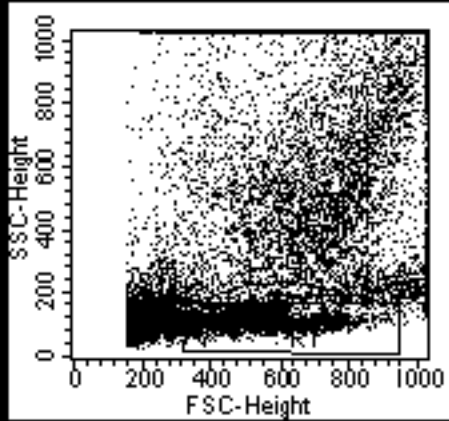
Uso improprio dei sistemi automatici di lisi



Con lisante BD: solo problemi di lisi insufficiente

Le popolazioni a destra della nuvola dei linfociti già fissati sono monociti e linfociti di tutti i fenotipi, che verrebbero esclusi dal gate

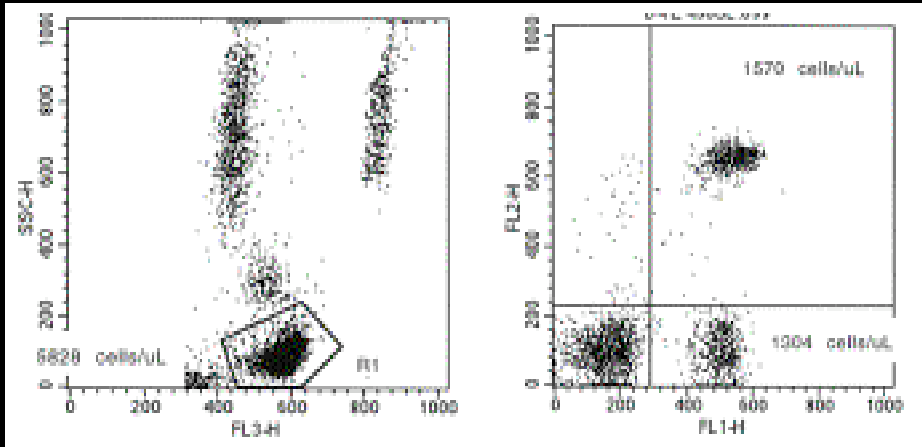
Problemi di lisi



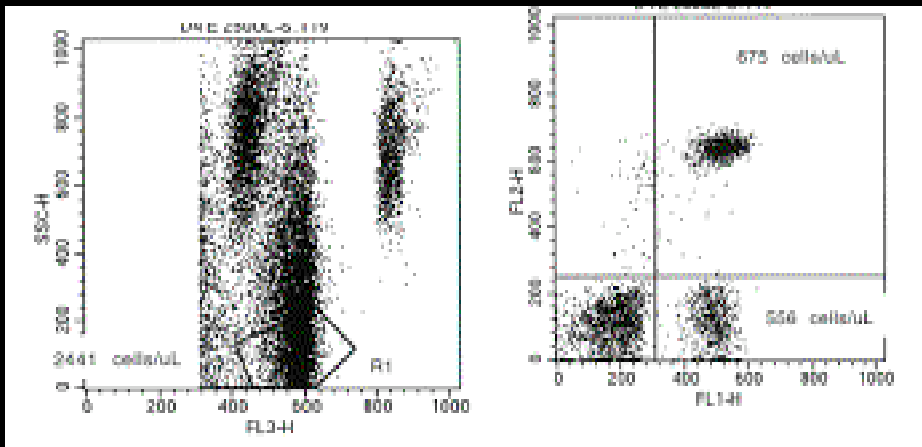
Doppio colore con gate fisico:
lisi con > volume di lisante che
con gate immunologico

Lisi incompleta

Volume della soluzione lisante

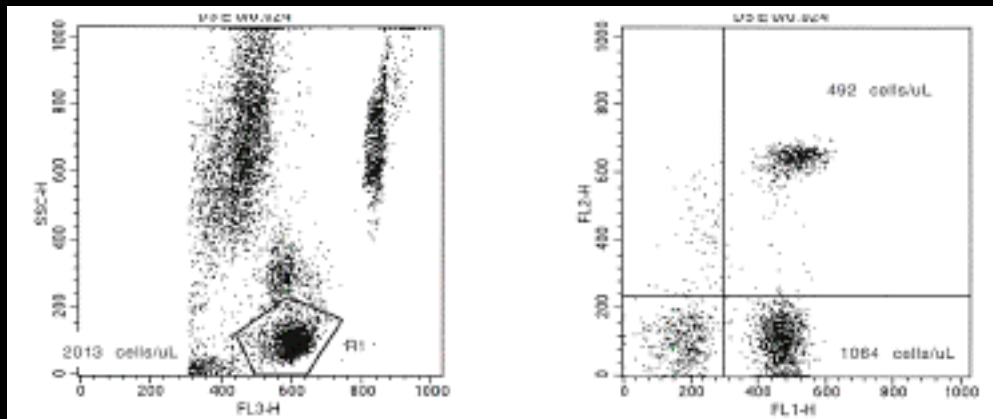


500 µl

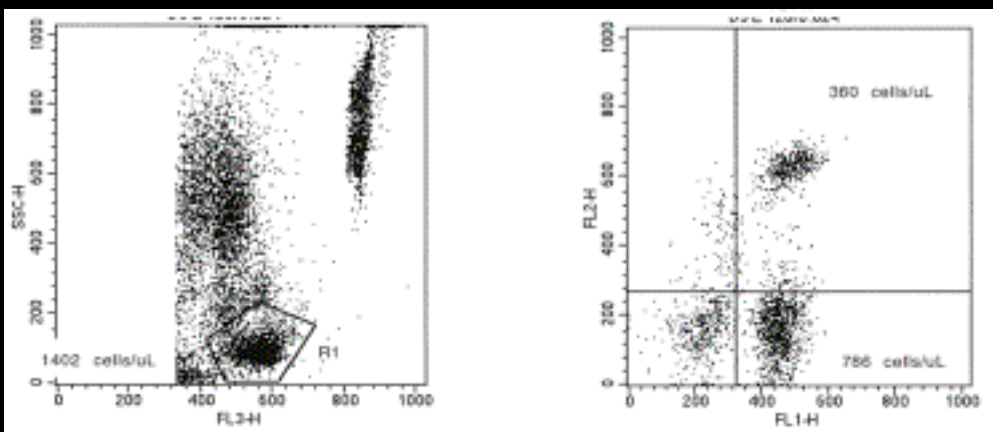


250 µl

Variabili legate ai campioni

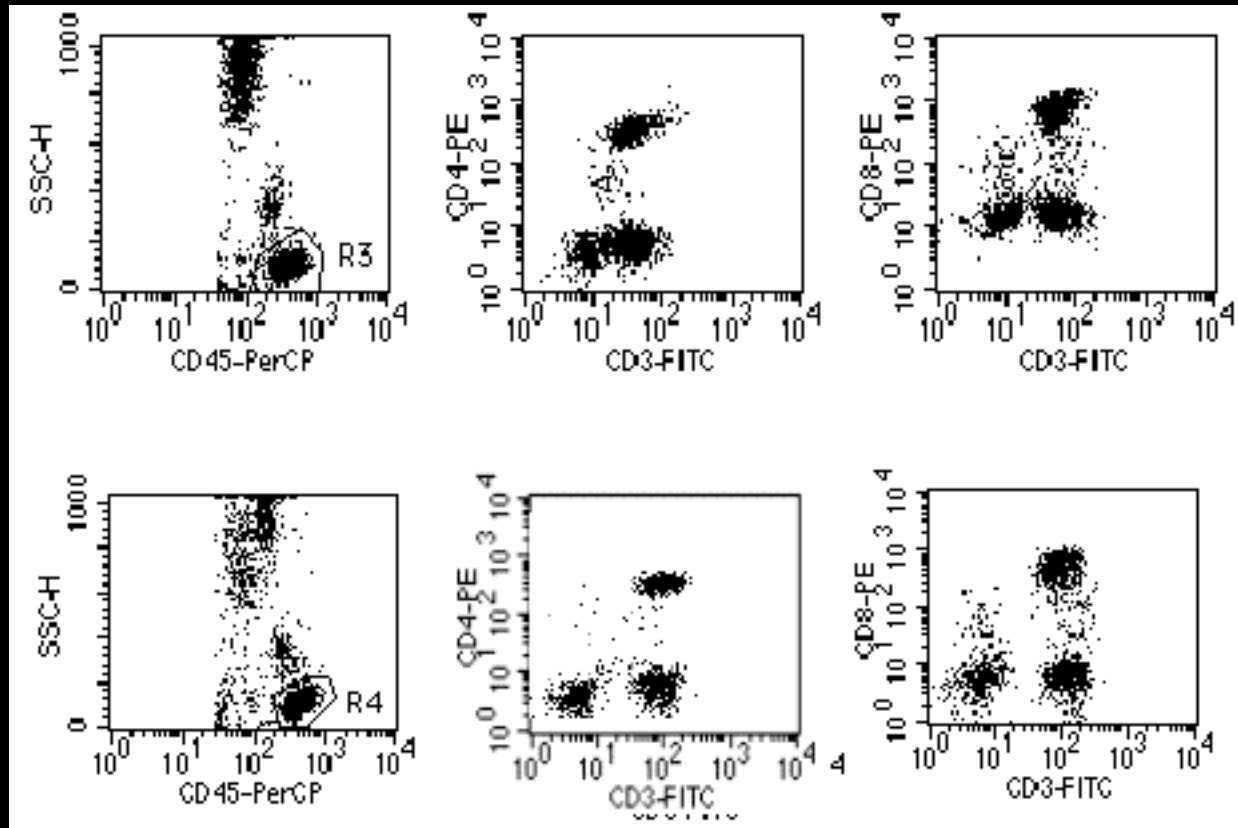


FRESCO



VECCHIO

Sostanze interferenti



**DOPO
LAVAGGIO**