

## Standardizzazione delle attività per l'armonizzazione dei risultati

M. Pradella

Laboratorio Analisi, Ospedale civile di Castelfranco Veneto, TV.

**Riassunto:** L'esame urine è stato oggetto di numerosi tentativi di standardizzazione, con risultati ancora insoddisfacenti.

I documenti disponibili risentono profondamente di condizioni operative specifiche delle diverse nazioni. Quelli statunitensi sono condizionati dalla pervasività delle regole di accreditamento, tanto da risultare talvolta generici, mentre quelli europei sono più tecnicamente approfonditi ma poco maneggevoli per alcune situazioni, come i *point-of-care*.

Tra le diverse procedure che compongono l'esame delle urine, il controllo di qualità interno presenta numerose difficoltà pratiche, che i documenti standard e le linee guida non sempre aiutano a superare. La soluzione probabilmente può essere trovata nell'ambito delle norme disponibili, se però non ci si limita a quelle dedicate alle urine ma si prendono in considerazione anche quelle per le analisi nei *point-of-care* e quelle generali per la qualità dei metodi. Gli operatori sanitari, sia nei laboratori che in altre strutture, trarrebbero vantaggio dallo sviluppo e dalla manutenzione costante di linee guida tecniche specifiche ed approfondite sulla qualità dell'esame delle urine nelle diverse condizioni cliniche e organizzative.

### Introduzione: documenti standard

Poche attività di medicina di laboratorio sono state oggetto di tentativi di standardizzazione come l'esame urine.

Poche attività di standardizzazione hanno probabilmente dato risultati insoddisfacenti come quella dell'esame urine.

Esistono diverse generazioni di documenti per standardizzare la raccolta del campione e l'esecuzione dell'analisi chimica o microbiologica.<sup>1</sup> Il numero e la varietà sono sintomo della difficoltà ad affrontare razionalmente la materia.

Il National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) serve il suo paese ed il mondo intero (con il cosiddetto "Programma di globalizzazione") producendo standard e linee guida per le attività sanitarie, in particolare quelle diagnostiche di laboratorio.

Il motto del NCCLS è: *Serving the World's Medical Science Community Through Voluntary Consensus*. Principio fondamentale è perciò che il consenso sia un modo efficace ed efficiente (*cost-effective*) per migliorare le attività sanitarie. NCCLS produce standard, linee guida e rapporti.

Per il nostro argomento sono interessanti i primi due tipi di documento.

*Standard* è un documento sviluppato attraverso un processo di consenso che identifica chiaramente requisiti specifici ed essenziali per materiali, metodi o procedure da utilizzarsi come stanno, senza modifi-

che. Gli eventuali elementi discrezionali sono chiaramente identificati.

*Linea Guida* è invece un documento, sviluppato attraverso un processo di consenso, che descrive criteri per pratiche operative generali, procedure o materiali, da utilizzare volontariamente, come sta scritto, o può essere modificata per speciali necessità.

Il Processo di Consenso è un protocollo che stabilisce criteri formali per autorizzare un progetto, sviluppare e revisionare in modo aperto i documenti, rispondere ai commenti degli utilizzatori, accettare infine un documento come Standard o Linea Guida. I documenti si trovano per lo più al livello di "proposed" o di "approved." Alcuni, che hanno bisogno di valutazioni sul campo o di raccolta dati, si trovano in uno stadio intermedio ("tentative") di consenso. NCCLS ha prodotto svariati documenti sull'esame urine:

- NCCLS. Urine Sediment Analysis. NCCLS Guideline GP1-P2, 1995.<sup>2</sup>
- NCCLS. Collection and Transportation of Single Collection Urine Specimens; Proposed Guideline. NCCLS document GP8-P, 1985.<sup>3</sup>
- NCCLS. Collection and Preservation of Timed Urine Specimens; Proposed Guideline. NCCLS document GP13-P, 1987.<sup>4</sup>
- NCCLS. Routine Urinalysis; Proposed Guideline. NCCLS document GP16-P, 1991.<sup>5</sup>
- NCCLS. Routine Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Tentative Guideline. NCCLS docu-

- ment GP16-T, 1992.<sup>6</sup>
- NCCLS. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline. NCCLS document GP16-A, 1995.<sup>7</sup>
  - NCCLS. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline — Second Edition NCCLS document GP16-A2<sup>8</sup>.

Sono altresì interessanti per l'argomento i seguenti documenti:

- NCCLS. Point-of-Care In Vitro Diagnostic (IVD) Testing; Approved Guideline. NCCLS document AST2-A, 1999.<sup>9</sup>
- NCCLS. Wellness Testing Using IVD Devices; Approved Guideline. NCCLS document AST3-A, 1999<sup>10</sup>.
- NCCLS. Provider-Performed Microscopy Testing; Proposed Guideline. NCCLS document HS2-P, 2000<sup>11</sup>.

I contributi europei non sono mancati, anche se in numero minore e prevalentemente nazionali e microbiologici, almeno inizialmente.<sup>12,13</sup> Solo i documenti più recenti, tuttavia, affrontano abbastanza apertamente le indicazioni cliniche, oltre alle procedure di laboratorio.<sup>14</sup> Analizzando le indicazioni cliniche si giunge alla conclusione che probabilmente esistono differenti "esami delle urine" con differenti livelli di sofisticazione. Ad esempio, per la diagnosi di infezione delle vie urinarie si possono distinguere tre livelli di analisi delle particelle:

1. screening, con refertazione su scala ordinale
2. procedure standardizzate con scopi specifici: Gram, sedimento standardizzato e colorazione sovravitale e/o contrasto di fase, conteggio in camera delle urine non centrifugate (quantitativo)
3. identificazione e quantizzazione accurata e precisa, con citocentrifugazione e colorazione di Gram.

Il numero di commenti inviati a NCCLS sui documenti per le urine, in particolare sull'edizione 1995 del GP16, sono un altro indice dell'interesse suscitato dall'argomento e delle difficoltà per raggiungere un punto di accordo generale (Tabella I), specie se confrontati con documenti di interesse molto vasto come quelli della serie AST (point-of-care) ed il C24 del controllo di qualità interno.

### Documenti standard per l'esame delle urine

Confrontando l'indice delle principali linee guida sull'esame delle urine (Tabella II) emergono due elementi: la somiglianza di NCCLS GP16-A2 2001 con il precedente NCCLS GP16-A del 1995; la maggiore estensione in particolari tecnici e considerazioni cliniche del documento europeo ECLM 2000. La somiglianza tra i due GP16 è indice di staticità e forse conservatorismo, tanto più che la revisione del documento del 1995 è iniziata sotto la

**Tabella I.** I commenti inviati nel processo di consenso di NCCLS

Documento	commenti
NCCLS document GP16-A 1995 – Urinalysis	197
NCCLS document GP16-A2 2001 – Urinalysis	21
NCCLS document GP16-T 1992 - Routine Urinalysis	132
NCCLS document AST2-A - Point of care IBD	90
NCCLS document AST3-A - Wellness testing	26
NCCLS document AST4-A - Blood glucose without laboratory support	28
NCCLS document HS2-P - Provider-performed microscopy	
NCCLS document C30-A - Blood glucose in acute and chronic care	13
NCCLS document C24-A2 - Statistical Quality control	8

spinta di un numero enorme di commenti pervenuti al Comitato, del rinnovo profondo della composizione dello stesso Comitato e della comparsa per l'appunto delle norme europee ECLM 2000.<sup>15</sup>

La scelta di mantenersi su livelli generali, senza approfondimenti tecnici troppo specifici è stata quindi consapevole e meditata.

Più che la lettura analitica delle affermazioni contenute nella linea guida **NCCLS GP16** è interessante esaminare l'intenso dibattito testimoniato dai commenti giunti al comitato, ciascuno corredato dalla rispettiva risposta.

Come si vede nella Tabella III e nella Tabella IV, i commenti hanno toccato tutti gli argomenti, in generale spingendo per aumentare il livello di specificità delle regole, salvo eccezioni come quella della misura del volume del sedimento. Le risposte del Comitato sono state in molti casi positive ed hanno comportato l'accoglimento nel testo del suggerimento. In diversi casi il Comitato ha respinto la richiesta di maggiore specificità, in alcuni infine la risposta non appare corrispondente al testo della linea guida o comunque può essere giudicata discutibile.

Obiettivo del Comitato sembra quello di descrivere la prassi esistente, con la sua variabilità, le sue contraddizioni e le sue inconsistenze, più che quello di spingere per un miglioramento.

### Controllo di qualità interno

Un settore particolarmente delicato dell'attività analitica è costituito dal controllo di qualità.

Nessuna attività diagnostica, ai fini dell'accreditamento e del sistema qualità, è esentata dall'obbligo del controllo di qualità (regola 5.6.1 di EN ISO 15189.2).<sup>17</sup>

Va ricordato che nel "controllo di qualità" (distinto dalle altre attività legate in qualche modo alla qualità) sono comprese le "procedure intese per il monitoraggio delle prestazioni analitiche (da non confondere con le verifiche elettroniche, o "check") al fine di segnalare problemi che potrebbero limitare l'utilità di un risultato per gli scopi medici".<sup>18</sup>

**Tabella II.** Confronto dell'indice dei principali documenti con linee guida sull'esame dell'urine

NCCLS document GP16-A 1995	NCCLS document GP16-A2 2001	European Urinalysis Guidelines ECLM 2000 <sup>16</sup>
1 Introduction	1 Introduction	1 Introduction
2 Materials and Equipment	2 Materials and Equipment	2 Medical needs for urinalysis
3 Macroscopic/Physical Urinalysis	3 Macroscopic/Physical Urinalysis	3 Patient preparation
4 Chemical Urinalysis	4 Chemical Urinalysis	4 Collection of specimens, preservation and transport
5 Microscopic Examination of Urine	5 Microscopic Examination of Urine	5 Chemistry examinations
6 Automated Urinalysis	6 Automated Urinalysis	6 Particle analysis
7 Quality Assurance	7 Quality Assurance	7 Microbiology examinations
8 Collection and Transportation of Single-Collection Urine Specimens	8 Collection and Transportation of Single-Collection Urine Specimens	8 Stepwise strategies in urinalysis
9 Collection and Preservation of 24-Hour Urine Specimens	9 Collection and Preservation of 24-Hour Urine Specimens	9 Quality assurance
		Ann 10 Transmission of information and detail of pre- and post-analytical stage
		Ann 11 Detail of chemistry examinations
		Ann 12 Detail of particle analysis
		Ann 13 Detail of microbiology examinations

**Tabella III.** Selezione di commenti e risposte per NCCLS GP16-A (1995) (\*: punti non chiari, contraddittori o discutibili)

Commento	Risposta Comitato
Unire le diverse raccolte insieme?	Combina GP8-P (raccolta 8 ore), GP13-P (raccolta 24 ore) e GP16-P (analisi urine "routine")
Separare raccolta da analisi?	Gli operatori coinvolti sono diversi.
Poca attenzione all'automazione?	Focalizzato sul metodo manuale, ma alcuni principi valgono per quello automatizzato. La sezione 6 tratta dei metodi automatizzati.
Aggiungere microscopia automatizzata:	In 5.2, ma generica, senza dettagli tecnici. Vantaggi: maggiore riproducibilità.
Droghe d'abuso o sostanze chimiche ed effetti sulle strisce	Ogni produttore le sue specifiche.
Smaltimento delle urine:	In conformità alle norme locali, solo un riferimento in sezione 1.
Indicazioni per urocoltura dip slide? Addis?	Oltre lo scopo del GP16.
Microscopia non eliminabile senza studi sensibilità? Almeno 1000 urine per contare falsi negativi	Decisione del singolo laboratorio, in base alla propria popolazione.
Ampliare parte della raccolta?	GP16 riguarda l'analisi del laboratorio, non la raccolta
Il termine "routine" viene dai nefrologi, ogni laboratorio dovrebbe precisamente definirlo	GP16 ha cancellato il termine routine
Microscopia sui negativi delle strisce?	GP16 vuole essere valido per tutte le situazioni.
Si dovrebbe raccomandare un contenitore secondario	8.7.1 prevede un contenitore secondario per il trasporto
Contenitori e tappi di plastica, trasparenti per osservare aspetto e colore	8.6 contenitori trasparenti e monouso
Contenitori e pipette senza sostanze particolate	8.6.1 contenitori senza sostanze particolate
Contenitori grandi abbastanza per ripetere due volte	8.9.1 contenitori grandi abbastanza per ripetere due volte
Contenitori chiusi abbastanza per poter risospendere il sedimento senza perdite	OK
Rischi del trasferimento del sedimento	2.1.3 si raccomandano pipette per il trasferimento
Riutilizzo del materiale proibito	Una linea guida raccomanda, non obbliga
Non riutilizzare i vetrini	2.1.4 vetrini monouso
Etichettare i vetrini	2. etichettare contenitori, provette e vetrini
Calibrazione certificata dei vetrini e verificata periodicamente dal laboratorio	Oltre lo scopo del GP16
Specificare volumi e conservanti	Specifici per ciascun metodo
Etichettare le strisce	Va stabilito un meccanismo per garantire l'identificazione corretta del paziente (non riportato nel testo)
Specificare il tempo di contatto della striscia	2.1.5 raccomanda l'uso immediato
Conservazione prolungata: servono riferimenti bibliografici	2.1.6 e 9. con riferimenti bibliografici per la conservazione
Obiettivo 100x a immersione	2.2.1 obiettivi 10x e 40x
Obbligatorio lo strumento lettore della striscia	2.2.2 ammessa la lettura visuale
Controllo di qualità per lo strumento lettore	2.2.2 seguire le istruzioni del fabbricante
Specificare la calibrazione, partendo dall'assorbimento molare del cromoforo	2.2.2.2 gli strumenti sono molto variabili: seguire le istruzioni del fabbricante
Oscillazione armonica per il peso specifico	3.4 peso specifico con rifrattometro, oscillazione armonica, colorimetria su striscia, idrometro
Centrifugazione sotto cappa	Centrifughe chiuse a tenuta
Provette chiuse durante la centrifugazione	2.1.1 provette chiuse per evitare schizzi e aerosol
Specificare i limiti di accettabilità della centrifugazione	2.2.4.2 centrifugare a circa 400 RCF. Non ci sono dati pubblicati sulla varianza.
Serve una misura della frenata della centrifuga, per evitare la risospensione del sedimento	2.2.4.1 la centrifuga resta bloccata quando è in movimento. 5.3.3 la centrifuga non deve frenare (ma non è scritto)
Servono i principi della accettabilità della variazione di un blocco di colore nel controllo di qualità	2.3.1 i limiti vanno stabiliti dal laboratorio

Frequenza del QC: all'apertura della confezione ed all'ultima striscia	2.3.1 QC almeno una volta al giorno ed all'apertura della nuova confezione. Embricare i lotti diversi di materiale di controllo
QC con materiale commerciale per il sedimento	2.3.2 non sono disponibili materiali per tutti gli elementi. Usare campioni ripetuti, nel laboratorio e tra laboratori.
Raccomandare la segnalazione delle terapie	3.1 sarebbe ideale che le terapie farmacologiche (es. con Vitamina C) venissero segnalate al laboratorio *
Usare una procedura standardizzata per l'eventuale diluizione con fisiologica dei campioni scarsi	5.3.1 i campioni scarsi andrebbero segnalati nel referto (non cita diluizione)
Servirebbe una carta di riferimento per i colori	3.3 metodologia e terminologia standard (ma senza dettagli) *
Metodo standard per colore: lateralmente o verticalmente? Effetto delle vitamine B e del piridio. Serve una scala terminologica per la torbidità	3.3 colore, aspetto e odore hanno raramente significato clinico. Rilevante solo l'odore ammoniacale.
Inserire osmometria	3.4 alternativa al peso specifico
Le strisce per il peso specifico non rilevano le sostanze non ioniche come il glucosio	3.5 OK
Le strisce per la chimica sono semplici e danno risultati semi-quantitativi	4.0 OK *
Proteine o albumina?	4.0 albumina
Quali corpi chetonici?	4.0 acido acetacetico e acetone, per esempio
Esterasi dei granulociti	4.0 esterasi dei leucociti
No sangue occulto	4.0 sangue/emoglobina
Consapevolezza negli operatori su sensibilità e specificità	4.3 addestramento degli operatori su sensibilità e specificità
Luce del giorno o lampada fredda a fluorescenza?	4.3 luce adeguata *
Servirebbero le caratteristiche dei metodi di conferma. La citazione non dovrebbe richiamare metodi commerciali (tavolette per bilirubina)	4.4 esami di conferma: a. sulfosalicilico, bilirubina, microscopia, batteriologia, citologia, analisi DNA (solo citati) * Gli esempi saranno tolti (?) *
Intervallo di riferimento per microscopia	5.0 ogni laboratorio misura i propri *
E' dimostrata la lisi di cellule e cilindri?	5.1 non ci sono dati sulla lisi di cellule e cilindri nelle 2 ore raccomandate
Coloranti con crystal violetto, pironina B e arancio di acridina.	5.2 seguire le istruzioni del fabbricante *
Contrasto di fase? Luce polarizzata?	5.2 utile il contrasto di fase, raccomandata la luce polarizzata per lipidi e cristalli *
Raccomandazioni per urine non centrifugate?	5.3 solo per urine centrifugate
Esprimere il sedimento come elementi per mL è inutile e costoso	5.3 il calcolo degli elementi per mL è solo un esempio *
Meglio risospendere in 1 mL che misurare il volume residuo	5.3 OK (?) *
Standardizzare elementi per HPF e LPF.	5.3 regole da stabilire nel laboratorio *
Standardizzare espressioni "semi-quantitative".	
Ogni operatore esegue prove di ripetibilità	E' buona pratica di laboratorio (ma non c'è nel testo) *
Ogni operatore dimostra competenza nel riconoscimento degli elementi e precisione nei gesti compiuti	La competenza del personale è richiesta dall'accreditamento *
Raggio: dal centro della centrifuga al fondo della provetta	5.3.3 OK
Rapporto di concentrazione: esempio 1:12, altri sistemi diversi	5.3.4 seguire le istruzioni del fabbricante *
Effetto del pH su cellule e cilindri	5.1 OK
Usare i coloranti specifici	5.4.2 raccomandati coloranti per un esame completo: oil red, gram, giemsa, Papanicolau, blu di Prussia
Mettere insieme QC e QA	7.0 sezione garanzia di qualità 5.5.1 e 5.5.2 sezione QC per la microscopia * 3.4.1 QA (QC?) per il peso specifico *
Procedure scritte, con limiti anche per microscopia, frequenza uno per serie, duplicati uno al giorno	5.5.1 procedure scritte 7.3 manuale con caratteristiche controlli * frequenza: secondo regole di accreditamento *
Citare strumento automatico per sedimento (1 solo per FDA, con 200 installazioni)	6.0 la linea guida vuole informare sulle tecnologie disponibili, non confrontarle
QC per automazione	6.0 (?) *
Procedure scritte per la raccolta, distribuite agli operatori, misura periodica della competenza	7.1 7.6 OK (?) *
Registrazione risultati con controlli, id operatore, lotto reagenti e materiali, risultato conferme	7.2 registrazioni secondo regole accreditamento *
Frequenza dei controlli (primo e ultimo)	Vedere istruzioni del fabbricante
Selezione soggetti di riferimento	v. NCCLS C28-A
Quando fare i test di conferma?	4.4 esistono i test di conferma. Non dice quando si usano. *
Variazioni da lotto a lotto	In conformità a regole per accreditamento *
Proficiency separato per fasi manipolative (semestrale) e fasi interpretative (quadrimestrale), più revisione settimanale dei dati registrati	Oltre lo scopo del GP16 - agli organizzatori di PT ed alle regole di accreditamento
Verifiche periodiche di adeguatezza dei campioni	8.9 (?) *
Verifica della vista e della capacità di vedere i colori	Non ci sono dati pubblicati sulla vista 7.6 difficoltà colori
Studi clinici per ematuria, piuria batteriuria (semiquantitative) da striscia	Studi in corso
Max 60 sedimenti al giorno	Regolamento ignoto
Sezione sulla raccolta prima di quelle sull'analisi	Importante la separazione tra raccolta ed analisi

Materiale dei contenitori privo di interferenze (inerte)	8.6.1 materiale inerte
Istruzioni scritte comprensibili dal paziente	8.3.2 istruzioni per il paziente
Raccolta con supervisione: solo per microbiologia	v. requisiti JCAHO
Sezione per disabili, infermi e neonati	8.5 neonati e bambini 8.2.3 pazienti fisicamente impediti
Cos'è una "toilette"	Salviette preconfezionate
Il sapone dovrebbe contenere un antibiotico	Non si conoscono studi in merito
Inutile il mitto intermedio pulito nelle donne	No
Documento separato per la raccolta	Il documento unico facilita la comunicazione e la comprensione tra gli operatori
Aggiungere una sezione per l'esame colturale	Esame colturale oltre gli scopi del GP16
Mettere insieme le raccolte per microbiologia	Sezione 8.6 (?) => 8.4.5 (!) *
Contenitore sicuro	8.7.1 Contenitore chiuso, senza perdite, per il trasporto

**Tabella IV.** Selezione di commenti e risposte a **NCCLS GP16-A2**

Commento	Risposta del Comitato
Troppo poco esteso? Poca microbiologia? Servirebbe un algoritmo per le infezioni urinarie	Raccolta e analisi chimico-microscopica tradizionale
Test di gravidanza?	No gravidanza
No 2 controlli al giorno, le strisce sono stabili.	La frequenza dovrebbe essere definita dal laboratorio, in relazione al carico di lavoro: per esempio, una confezione al mese = un controllo per settimana diverse confezioni al giorno = un controllo per confezione
Peso specifico: le strisce reattive non subiscono interferenze da mezzi di contrasto radiologici e sostituti del plasma, o da torbidità del campione	OK in 3.4
Non fare la microscopia è cattiva pratica?	5.0 GP16-A2 lascia le diverse alternative*
Microscopia: le unità di volume non hanno utilità clinica	5.3 la standardizzazione del volume del sedimento è opzionale *
Non ci sono riferimenti bibliografici per le indicazioni date sulla centrifugazione	5.2.2 5.2.3 i valori di 400 RCF per 5 minuti sono tradizionali
Esiste un solo sistema commerciale "standardizzato" per pipette a volume fisso e vetrini con camera?	5.2.4 5.2.5 il sistema "standardizzato" è citato ("si potrebbe considerare..."), non più raccomandato
Nessuno usa il calcolo del volume del sedimento? Sufficiente il risultato quantitativo per HPF o per LPF	5.2.6 il metodo quantitativo per volume serve per comparazione con quelli automatici; la goccia sul vetrino è sufficiente per la maggior parte dei casi *
Regole IATA?	8 vanno rispettate tutte le regole locali *
Le etichette vanno applicate dopo?	8.3.2 no: le etichette vanno applicate prima
Etichette sul contenitore, non sul tappo	8.6.6 OK
Campioni inadeguati per la microscopia quelli con contaminanti (cellule squamose, fibre esogene, "clue cells")?	8.8.2 OK ai criteri per accettabilità. Prima di scartare il campione, contattare il clinico
Conservanti aggiunti dagli operatori, dopo la raccolta?	9.1.3 no: per le raccolte di 24 ore, i conservanti devono essere nel contenitore prima della raccolta
Esistono contenitori che mantengono stabile il campione per 72 ore a temperatura ambiente	2.1.6 non è garantita l'assenza di interferenze su tutti i metodi
Manca la concentrazione dei conservanti?	Tabella: le concentrazioni variano da laboratorio a laboratorio e nel tempo

Procedure non facili con le urine per diverse ragioni: disponibilità e stabilità del materiale, incertezza sulla lunghezza della serie, incertezza sulla scala dei risultati (Qualitativa? Quantitativa?), quindi sulla rappresentazione grafica e sulle regole di controllo. Il risultato concreto è che in molti casi un vero, completo controllo di qualità non viene di fatto realizzato.

### Controllo di qualità nelle norme specifiche per le urine

Le linee guida disponibili non sono di molto aiuto. NCCLS GP8 (raccolta e trasporto) non parlava di monitoraggio, ma di un manuale con la descrizione dei campioni, dei loro requisiti e delle procedure.

Azioni preventive, sicuramente indispensabili, ma nulla sul monitoraggio.

NCCLS GP13 (urine temporizzate) non conteneva una sola riga sul monitoraggio della qualità.

NCCLS GP16-A2 contiene invece diversi riferimenti al controllo di qualità:

2.3 materiali e strumenti: restare aderenti ai regolamenti ed alle istruzioni del fabbricante (sic)

2.3.1 materiali positivi e negativi, per ciascun metodo chimico. I positivi dovrebbero essere debolmente reattivi

La frequenza dovrebbe essere definita dal laboratorio, in relazione al carico di lavoro: per esempio, una confezione al mese = un controllo per settimana diverse confezioni al giorno = un controllo per confezione.

I limiti vanno stabiliti dal laboratorio.

3.4.1 esame macroscopico e fisico: materiali di controllo utilizzati quotidianamente per il peso specifico, i cui risultati vanno documentati e conservati in conformità ai regolamenti governativi ed alle raccomandazioni scientifiche e cliniche regionali

5.4.1 procedura dell'esame microscopico: due materiali al giorno. Di fonte commerciale per eritrociti e leucociti, campioni duplicati per cilindri, cellule renali ed altri elementi corpuscolati

5.4.2 controllo di qualità della refertazione: nessuna indicazione di monitoraggio. Documentare l'identificazione e le azioni correttive relative ai risultati inattesi dei controlli

7. garanzia di qualità

7.2 registrazioni e archivio dei risultati, dei controlli, dei reagenti, degli operatori

7.3 manuale delle procedure

7.4 materiali e strumentazione

7.5 valutazione esterna di qualità

7.6 formazione permanente e addestramento

In tutta la sezione 7 di **NCCLS GP16-A2** non si trovano indicazioni per il monitoraggio della qualità conformi a NCCLS C24.

In **NCCLS HS2-P** (microscopia) la sezione 6 (Quality Assurance) cita procedure di controllo di qualità dei metodi. La sezione 6.5 descrive la difficoltà a trovare materiali adatti. Come controllo negativo si suggerisce il campione di un paziente. Si danno le raccomandazioni per le azioni da compiere in risposta a risultati inattesi del controllo. Le registrazioni del controllo di qualità vanno riviste mensilmente.

Nella sezione 7.5, specifica per il controllo di qualità del sedimento urinario, si raccomanda l'uso di materiali commerciali o, in mancanza, di campioni ripetuti.

Nelle linee guida europee (**ECLM European Urinalysis Guidelines, ECLM 2000**)<sup>16</sup> nella sezione 9.1.2.13 si raccomanda un controllo di qualità analitico basato sia su programmi esterni che sul controllo di qualità interno.

**Tabella V.** ECLM: Obiettivi analitici per la microscopia del sedimento urinario<sup>17</sup>

particella	concentrazione	percentuale massima di falsi negativi
eritrociti	10 (x 10 <sup>6</sup> /L)	20
	100 (x 10 <sup>6</sup> /L)	5
leucociti	20 (x 10 <sup>6</sup> /L)	10
	200 (x 10 <sup>6</sup> /L)	5
batteri (microscopico)	10 (x 10 <sup>6</sup> /L)	20
	100 (x 10 <sup>6</sup> /L)	5
cilindri	10 (x 10 <sup>6</sup> /L)	10
	50 (x 10 <sup>6</sup> /L)	5
batteri (colturale)	10 <sup>8</sup> /L	2
	10 <sup>7</sup> /L-10 <sup>8</sup> /L	5
	10 <sup>6</sup> /L-10 <sup>7</sup> /L	10

Si richiamano gli obiettivi analitici per i metodi chimici quantitativi (9.3: errore totale inferiore a 0.5 s intraindividuo, per il monitoraggio, o 0.25 s composta inter- e intra-individuale), con trasformazione logaritmica.

Per il conteggio di particelle (9.4) si richiamano invece gli obiettivi stabiliti per gli analizzatori ematologici, nel caso dei conteggi quantitativi, mentre per i risultati qualitativi ordinali si suggeriscono degli obiettivi espressi come percentuale massima di falsi negativi (Tabella IV). Lo stesso viene fatto per l'esame colturale. La variabilità dei risultati qualitativi dei materiali di controllo è descritta dalla variabile casuale binomiale (11.1.5).

**ECLM 2000** specifica altresì che il sistema informatico conservi i risultati del controllo di qualità per lunghi periodi, fino a 15 anni, mantenendoli accessibili agli operatori sia individualmente che in forma cumulativa.

L'analisi dei materiali di controllo deve essere quotidiana per i metodi chimici (11.1.6.1 - 11.1.6.2). Per la microscopia si prevede il doppio controllo degli stessi campioni con frequenza settimanale (12.1.2).

In definitiva, **ECLM 2000** è una norma più dettagliata di **NCCLS GP16-A2**.

Le indicazioni perentorie sul controllo di qualità, però, se danno qualche certezza sui materiali e sulla frequenza, non arrivano a descrivere precisamente l'analisi dei risultati, l'elaborazione grafica, le regole di controllo e le procedure di intervento, cioè le fasi in assoluto più difficili.

### Controllo di qualità nelle norme per i *point-of-care*

L'esame delle urine è incontestabilmente anche un metodo per *point-of-care*. In **NCCLS C30-A2** (glucosio nei "*point-of-care*") troviamo alcuni paragrafi con indicazioni precise per il controllo di qualità.

7.2 analisi del materiale di controllo almeno una volta per ogni lotto (in conformità a **NCCLS EP18**, qualità per i metodi monouso)

7.2.1 limiti dei risultati del controllo stabiliti dal direttore del programma di *point-of-care*; almeno 2 livelli di concentrazione, posti in intervalli clinicamente critici

7.2.2 analisi del materiale di controllo con frequenza regolare, almeno conforme alle regole di accreditamento ed alle raccomandazioni del produttore

7.2.3 analisi del materiale di controllo almeno una volta al mese per ogni operatore

7.2.4 analisi aggiuntive al cambio di lotto o alla sostituzione delle batterie, per indagare su risultati dubbi, nel sospetto di malfunzionamento dello strumento o di deterioramento dei reagenti

In **NCCLS AST4-A** (glucosio nei "*point-of-care*" senza laboratorio) in forma di domande per il coordinatore e per l'operatore si ripresentano (sezione II.6 e III.1) i medesimi concetti di **NCCLS C30-A2** e **NCCLS AST2-A**. In **NCCLS AST3-A** (*well-*

*ness screening*, ossia il check-up della salute) nella sezione 7 contiene molto sinteticamente gli stessi concetti.

In **NCCLS AST2-A** sono inserite disposizioni molto precise, divise addirittura in due sezioni: la 17 per l'esecuzione e la 23 per la documentazione.

Le principali direttive sono le seguenti:

17.0 monitoraggio eseguito dal personale che fa gli esami (precisazione solo apparentemente ovvia)

17.1 controlli sono analizzati prima ed insieme ai campioni dei pazienti. Attenzione anche alle fasi pre- e post-analitica

17.2 pianificazione specifica per la sede in cui viene fatto l'esame: ospedale, ambulatorio, ambulanza, elicottero, domicilio e per essere compresa dall'operatore meno addestrato (anche questo solo apparentemente ovvio)

17.3.1 frequenza compatibile con il volume di lavoro e le caratteristiche del metodo (serie analitica), dell'operatore e dell'organizzazione (per esempio potrebbe essere aumentata se gli operatori sono poco affidabili). I lotti diversi di materiale di controllo devono essere sovrapposti

17.3.2 la frequenza deve soddisfare almeno i requisiti del CLIA '88: ossia due livelli al giorno, scelti in corrispondenza dei punti clinicamente decisionali

17.3.3 replicati: sono quelli dei campioni dei pazienti. Ripetizione delle determinazioni singole se il risultato è inatteso (prassi discutibile, N.d.R.)

17.3.4 dispositivi monouso: ripetizione del risultato inatteso, quindi ripetizione di un nuovo controllo, infine fermo dello strumento per verifiche. Accurata documentazione dei risultati nell'ipotesi di scartare l'intero lotto di reagenti. Il controllo interno inserito in alcune tipi di "cartucce" può non essere sufficiente, a giudizio del Direttore del sito di point-of-care

17.3.5 sistemi multiuso: ripetizione del risultato inatteso, quindi chiamata del coordinatore dei point-of-care o di un tecnico esperto

17.3.5.1 cartucce "semi-quantitative" (ossia qualitative ordinali: tracce, positivo, molto positivo etc.): analisi del controllo esterno al sistema secondo le istruzioni del produttore e le regole di accreditamento, tipicamente al cambio di lotto ma non meno di una volta ogni sei mesi

17.3.6 revisione regolare dei risultati del controllo di qualità

17.3.7 il fabbricante del sistema analitico può proporre o fornire i materiali di controllo, mentre il fabbricante dei controlli è responsabile delle raccomandazioni sul loro uso

17.4.1 sistemi multiuso: per il CLIA '88 almeno due livelli al giorno

17.4.2 sistemi monouso: almeno una volta al giorno o nel giorno dell'analisi, prima del campione del paziente. Vanno usati regolarmente i controlli interni e quelli di tipo elettronico, ma va aggiunto sempre un materiale con matrice simile al campione dei pazienti

23.1 documentazione del controllo di qualità: nella forma di foglio di lavoro o registro (log) (un'altra

raccomandazione solo apparentemente ovvia, N.d.R.). Il registro dimostra che il metodo sta lavorando entro i limiti di accettabilità

23.2 obiettivi della registrazione: dimostrare l'analisi regolare del materiale di controllo, collegare la data di esecuzione a quella dei campioni dei pazienti, consentire la revisione a posteriori, contenere i riferimenti e la scadenza del lotto di reagenti, dello strumento usato e della sua manutenzione, dell'operatore, del suo addestramento e delle relative verifiche. I risultati non accettabili ("cattivi") non vanno omessi, ma le attività in risposta a questi eventi vanno invece registrate

23.3.1 operatore, paziente e campione vanno univocamente e separatamente identificati e registrati

23.3.2 si raccomanda una sola marca di dispositivi, ma comunque il laboratorio ha la responsabilità di confrontare gli strumenti tra di loro

23.3.3 la conservazione automatica dei risultati del controllo di qualità deve durare almeno un mese, da scaricare prima che vengano cancellati

23.3.4 le registrazioni dei risultati del controllo di qualità devono essere conservate per almeno due anni nei point-of-care, come accade nei siti professionali.

### Controllo di qualità per i dispositivi monouso

La striscia reattiva infine ha caratteristiche intermedie tra i reagenti liquidi tradizionali e le tavolette, cartucce e simili da utilizzarsi una sola volta (dispositivi "monouso"). **NCCLS EP18-P** (gestione della qualità per i dispositivi "monouso", *unit-use testing*)<sup>19</sup> prevede naturalmente un "controllo di processo" anche per questi metodi, citandolo in diversi punti:

5.2.6 procedure monitoraggio dei risultati dei controlli

5.2.7 frequenza del monitoraggio stabilita dall'utilizzatore sulla base delle raccomandazioni del produttore e dei regolamenti rilevanti

6.2 gli operatori frequenti, quelli che utilizzano il metodo almeno una volta alla settimana, analizzano un controllo liquido (non elettronico) almeno una volta per settimana. Gli altri lo analizzano ogni volta, una volta al giorno. L'intervallo di monitoraggio non dovrebbe superare 1/10 della stabilità dichiarata dal produttore. In pratica, per reagenti stabili un anno, almeno una volta al mese.

6.3 controllo di processo: come minimo, seguendo le raccomandazioni del produttore. Composizione e frequenza vanno definite tenendo conto di diversi fattori: rischio di errori, disponibilità del materiale, esperienza dell'operatore e dell'organizzazione, conseguenze mediche

6.3.1 controllo di qualità al cambio di una condizione (lotto, ambiente, operatore), con due livelli di materiale o con campioni di pazienti, con replicati in numero sufficiente a dimostrare l'eventuale presenza di un problema



6.3.2 controllo di qualità periodico, tradizionale, liquido: con materiale di controllo, aliquote di campioni di pazienti (*split samples*) e/o campioni da valutazioni esterne di qualità

6.3.3 aliquote di campioni (*split sample*): possibilmente freschi e distribuiti in un ampio intervallo di risultati, utili quando i materiali di controllo stabili non sono disponibili o non sono sufficienti per identificare l'origine della variabilità analitica

6.3.4.1 controllo elettronico: verifica solo lo strumento di lettura. Va accompagnato dai controlli non elettronici.

**NCCLS EP18-P** ha infine il merito di collegare i dispositivi diagnostici alle norme generali per i dispositivi medici ISO 13485<sup>20</sup> e ISO 14971-1<sup>21</sup>.

### Soluzioni alle difficoltà

Nessuno dei documenti standard affronta in dettaglio l'analisi dei risultati del controllo di qualità né offre esempi adeguatamente esplicativi. Esempi che in un settore così particolare sarebbero stati di grande utilità.

In effetti, l'analisi dei risultati del controllo di qualità dell'esame urine presenta difficoltà del tutto peculiari. Difficoltà di fronte a cui non raramente l'operatore non sensibilizzato soccombe, ingannato da luoghi comuni purtroppo molto diffusi e persino sostenuti in documenti prodotti da società scientifiche.<sup>22</sup>

Una delle difficoltà principali è dovuta alla scala di misura. La scala dei risultati dell'esame urine con strisce reattive è di tipo qualitativo ordinale. L'aggettivo "semi-quantitativa", largamente usato, non ha fondamento scientifico ma comporta gravi inconvenienti operativi. Non esistono infatti procedure statistiche per variabili "semi-quantitative", mentre sono ben definite quelle per variabili quantitative e per variabili qualitative ordinali o nominali.

Nell'ambito del progetto della European Confederation of Laboratory Medicine (**ECLM**) per la standardizzazione dell'esame urine, il gruppo di lavoro ha chiaramente identificato la scala qualitativa ordinale<sup>23</sup>, conforme alle specifiche generali sulle scale di misura<sup>24</sup>.

Il gruppo di lavoro ECLM propone l'individuazione di due limiti: uno di sensibilità analitica (LD) ed uno di conferma (LC), che racchiudano una "zona grigia" di incertezza. LC dovrebbe essere (decisione arbitraria basata sull'esperienza) 5 volte LD. LC ed LD sono però anche legati alla decisione clinica: per esempio, 100-200 leucociti per mL sono indicativi di infezione urinaria, mentre meno di 10-20 la escludono. I risultati sovente richiedono la trasformazione logaritmica.

La valutazione della striscia verrebbe effettuata separatamente a LC e LD. A LC è raccomandato che i falsi negativi siano inferiori al 10%, mentre a LD è raccomandato che siano i falsi positivi ad essere in-

feriori al 10%. Nella zona grigia potremmo accontentarci di falsi negativi inferiori al 30%. Le raccomandazioni ideali potrebbero essere abbassate al livello minimo rispettivamente di 20%, 20% e 50%.

Il confronto da metodi diversi non può avvalersi dei metodi statistici per variabili quantitative. Perciò, devono essere utilizzati metodi come il test di simmetria di McNemar o il coefficiente *k* di Cohen.<sup>25</sup>

La precisione di misure in una scala ordinale non può essere misurata con la deviazione standard. Perciò, oltre alla possibilità sempre presente di utilizzare metodi non parametrici, si suggerisce l'applicazione dei coefficienti binomiali, considerando non il risultato in sé ma la percentuale di concordanza con l'atteso. Sempre raccomandando la selezione di valori vicini ai valori critici piuttosto che estremi in classi aperte (1+ è meglio di 3+).

Trattandosi quindi di risultati di tipo ordinale, può essere utile esaminare il documento **NCCLS EP12-A** (valutazione dei metodi qualitativi).<sup>26</sup> Pur non essendo una norma specifica per il controllo di qualità, nella sezione 7 (risultati della riproducibilità) troviamo il metodo per l'utilizzo di un materiale vicino al *cut-off*, ossia il punto in cui un campione ripetuto fornisce risultati positivi e negativi nella proporzione del 50%. L'intervallo tra le concentrazioni sopra e sotto il *cut-off* che danno 95% di positivi e 95% di negativi è chiamato "intervallo 95%".<sup>27</sup> È possibile verificare (sezione 7.3 di **NCCLS EP12-A**) se l'intervallo  $\pm 20\%$  intorno al *cut-off* comprende o meno l'intervallo 95%.

Il monitoraggio della qualità analitica può seguire un percorso simile. Un materiale opportunamente preparato dovrebbe dare risultati positivi e negativi con una frequenza stabilita, a seconda della sua distanza dal *cut-off*. La modifica di questa frequenza sta ad indicare una variazione nelle caratteristiche del metodo (se si esclude la variazione nelle caratteristiche del materiale di controllo).

### Commenti e conclusioni

Il panorama odierno degli standard sull'esame urine è caratterizzato da spiccata eterogeneità. Abbiamo norme americane, largamente generiche o addirittura reticenti in vari punti, tra cui le specifiche dei metodi ed il controllo di qualità analitico. In contrasto, altre norme americane indirizzate ai point-of-care sono almeno sul controllo di qualità molto più precise, coerenti tra loro e con gli standard fondamentali come **NCCLS C24-A2**. La situazione americana è però singolare per la pervasività delle regolamentazioni di accreditamento, che giungono a livelli di dettaglio, togliendo quindi spazio alla normazione volontaria.

Al contrario in Europa la mancanza di regolamenti stringenti di accreditamento ha forse favorito lo sviluppo di norme volontarie come ECLM 2000. Norme basate su un meccanismo di consenso molto



largo, molto qualificato scientificamente ma meno aperto di quello NCCLS. Molto più dettagliate sugli obiettivi medici dell'indagine di laboratorio, sui metodi analitici e sul controllo di qualità.

Se ne ricava una certa sensazione di insoddisfazione. Manca qualcosa. Probabilmente manca la ridefinizione degli obiettivi clinici e del meccanismo di selezione di questi obiettivi e dei metodi funzionali a loro ed al contesto organizzativo, un contesto che lo sviluppo dei point-of-care ed il consolidamento delle strutture sta cambiando rapidamente. Non è difficile prevedere che in un futuro non molto lontano l'esame delle urine (o meglio, gli esami delle urine) saranno diversi da quelli che abbiamo conosciuto fino ad oggi.

## Bibliografia

- Aspevall O, Hallander H, Gant V, Kouri T. European guideline for urinalysis: a collaborative document produced by European clinical microbiologist and clinical chemist under ECLM in collaboration with ESCMID. *Clinical Microbiology and Infection* 2001;7:173-8.
- NCCLS. Urine Sediment Analysis. JCCLS Guideline GP1-P2. Kobe: Toa Medical Electronics Ltd, 1995.
- NCCLS. Collection and Transportation of Single Collection Urine Specimens; Proposed Guideline. NCCLS document GP8-P. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1985.
- NCCLS. Collection and Preservation of Timed Urine Specimens; Proposed Guideline. NCCLS document GP13-P. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1987.
- NCCLS. Routine Urinalysis; Proposed Guideline. NCCLS document GP16-P. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1991.
- NCCLS. Routine Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Tentative Guideline. NCCLS document GP16-T. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1992.
- NCCLS. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline. NCCLS document GP16-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1995.
- NCCLS. Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline — Second Edition NCCLS document GP16-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2001.
- NCCLS. Point-of-Care In Vitro Diagnostic (IVD) Testing; Approved Guideline. NCCLS document AST2-A [ISBN 1-56238-375-2]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 1999.
- NCCLS. Wellness Testing Using IVD Devices; Approved Guideline. NCCLS document AST3-A (ISBN 1-56238-370-1). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 1999.
- NCCLS. Provider-Performed Microscopy Testing; Proposed Guideline. NCCLS document HS2-P NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2000.
- Koivula T, Grönroos P, Gävert J et al. Basic urinalysis and urine culture: Finnish recommendations from the working group on clean midstream specimens. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50(suppl 200): 26-33.
- Gatermann S, Podschun R, Schmidt H et al. Fachgruppe 'Diagnostische Verfahren in der Mikrobiologie' der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, DGHM. Harwegsinfektionen. Qualitätsstandards: in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. MiQ. Berlin: Gustav Fischer, 1997.
- Hallander H, Hofmann W, Guder WG, eds. ECLM. European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60(suppl 231):1-96.
- Pradella M. NCCLS - il comitato di area per le "attività generali del laboratorio". *Riv Med Lab - JLM* 2000;1(3):63-4.
- Hallander H, Hofmann W, Guder WG, eds. ECLM. European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60(suppl 231):1-96.
- prEN ISO/DIS 15189:2002. Medical Laboratories - Particular requirements for quality and competence. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2002.
- NCCLS. Internal quality control testing: principles and definitions. Approved guideline - second edition. NCCLS document C24-A2. National Committee For Clinical Laboratory Standards. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 1998.
- NCCLS. Quality management for unit-use testing. Proposed guideline. NCCLS document EP18-P. National Committee For Clinical Laboratory Standards. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2000.
- ISO 13485:1996. Quality system - Medical devices - Particular to the application of ISO 9001. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1996.
- ISO 14971-1:1998. Medical devices - Part 1: Application of risk analysis. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1998.
- Pradella M. Controllo di qualità interno: luoghi comuni e linee guida. *Riv Med Lab - JLM* 2001;2:51-3.
- Kouri T, Laippala P, Kutter D, Gant V, Hallander H, Guder WG. Quality specification for ordinal scale measurement with multiproperty (multiple) urine test strips. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:523-6.
- Dybkaer R, Joergensen K. Measurement, value and scale. *Scand J Clin Lab Invest* 1989;49 suppl 194:69-76.
- Winkens RAG, Leffers P, Degenaar CP, Houben AW. The reproducibility of urinalysis using multiple reagent test strips. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:813-8.
- NCCLS. User Protocol for Evaluation of Qualitative test Performance. NCCLS document EP12-A. National Committee For Clinical Laboratory Standards. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
- European Committee for Clinical Laboratory Standards. Guidelines for evaluation of diagnostic kits. Part 2. General principles and outline procedures for the evaluation of kits for qualitative tests. Lund, Sweden: ECCLS; 1990.