

I.Z.S.L.E.R.	COSTRUZIONE E COMPILAZIONE DI CARTE DI CONTROLLO DA UTILIZZARE IN SIEROLOGIA PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI NEI METODI ELISA E IN MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI DELLA RT-PCR	IO BG/024 REV. 6 Data emissione 08/02/2019 Pag. 1 di 5
---------------------	---	---

V.Tranquillo	F.Paterlini	V.Tranquillo	F.Paterlini	Nuova versione della procedura per la costruzione delle carte di controllo in ambiente R e aggiornamento dei relativi doc.corr.
STESURA	VERIFICA	CONVALIDA	APPROVAZIONE	MOTIVO REVISIONE

1. TITOLO

ISTRUZIONE OPERATIVA PER LA COSTRUZIONE E COMPILAZIONE DI CARTE DI CONTROLLO DA UTILIZZARE IN SIEROLOGIA PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI NEI METODI ELISA

2. SCOPO (OGGETTO) E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente istruzione operativa fornisce le indicazioni per la costruzione e la compilazione delle carte di controllo da utilizzare in sierologia per monitorare i valori dei Controlli utilizzati nei metodi ELISA. Si applica ai metodi ELISA in uso nel laboratorio di Sierologia e ai metodi RT-PCR in uso nel laboratorio di Microbiologia degli alimenti.

3. DEFINIZIONI

Carta di controllo

Strumento grafico-statistico che permette di monitorare l'andamento dei valori di un parametro specifico di cui sono stabiliti statisticamente, o per convenzione valori limiti entro i quali deve distribuirsi la variabilità delle osservazioni del parametro.

4. MODALITÀ

4.1 Generalità

Le Carte di Controllo (CC) sono uno strumento utilizzato nell'ambito del controllo statistico di qualità per monitorare lo stato di un processo produttivo. Definita la variabilità del processo produttivo sotto esame attraverso uno studio della distribuzione del parametro del processo oggetto del controllo, si procede a descrivere in forma grafica la localizzazione dei valori del parametro durante il processo produttivo. In base alla natura del processo e del parametro sotto controllo si possono adottare diverse forme di CC. Sono descritte le CC per variabili, quando il parametro è di natura quantitativa e si dispone delle risorse adeguate a misurare in modo efficace attraverso un corretto campionamento dei valori del parametro in esame, oppure la CC per attributi quando il parametro di interesse è a carattere dicotomico del tipo conforme/non conforme.

Nell'ambito delle attività del laboratorio di sierologia vengono utilizzati metodi di prova basati sulla tecnica immunoenzimatica ELISA. Tutti i metodi ELISA sono caratterizzati dallo svolgersi in apposite piastre con un numero determinato di pozzetti all'interno del quale avviene la reazione immunoenzimatica che permette di identificare la presenza di anticorpi o antigeni a seconda della particolare tecnica eseguita. Ogni piastra prevede la presenza di sieri di controllo positivi e controlli negativi. Si tratta di materiale specifico per ogni lotto che compone un kit per l'esecuzione di un determinato numero di campioni. Ogni piastra è validata sulla base di criteri (forniti dal produttore del kit) dei valori di DO o combinazioni lineari degli stessi, ottenuti nei controlli. Sulla base di queste informazioni deriva che i valori dei controlli positivi e negativi presenti nelle singole piastre sono critici per l'esecuzione della prova. Il processo sotto esame è la produzione di risultati validi ai fini dell'interpretazione diagnostica dei risultati delle prove. Quindi il processo è da intendersi sotto controllo quando i valori dei controlli in piastra o una combinazione lineare degli stessi rispettano i criteri di validità riportati nel metodo di prova.

Le CC individuano due tipi di variabilità. La "variabilità casuale" o dovuta a cause non identificabili e la "variabilità sistematica" che rappresenta, quando presente, una reale alterazione del processo ed è da attribuire a cause evidenti ed identificabili di variazione del processo. Le CC aiutano ad individuare

I.Z.S.L.E.R.	COSTRUZIONE E COMPILAZIONE DI CARTE DI CONTROLLO DA UTILIZZARE IN SIEROLOGIA PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI NEI METODI ELISA E IN MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI DELLA RT-PCR	IO BG/024 REV. 6 Data emissione 08/02/2019 Pag. 2 di 5
--------------	--	--

andamenti non naturali di variazioni in dati risultanti da processi ripetitivi e forniscono criteri per evidenziare l'assenza di controllo statistico. Un processo è in controllo statistico quando la variabilità dipende soltanto da cause non identificabili. Stabilito il livello di accettabile variazione, ogni deviazione da questo livello, è ritenuta essere il risultato di cause identificabili che dovrebbero essere quindi indagate ed eliminate o ridotte.

L'obiettivo della CC dei controlli in piastra ha quindi lo scopo di tenere traccia dei valori dei controlli osservati e della conseguente accettabilità o meno dei risultati e di monitorare la presenza di tendenze nei valori dei controlli in piastra al fine di identificare cause di variazioni sistematiche della variabilità del processo ed eventualmente eliminarle o ridurle.

4.2 Costruzione delle carte di controllo

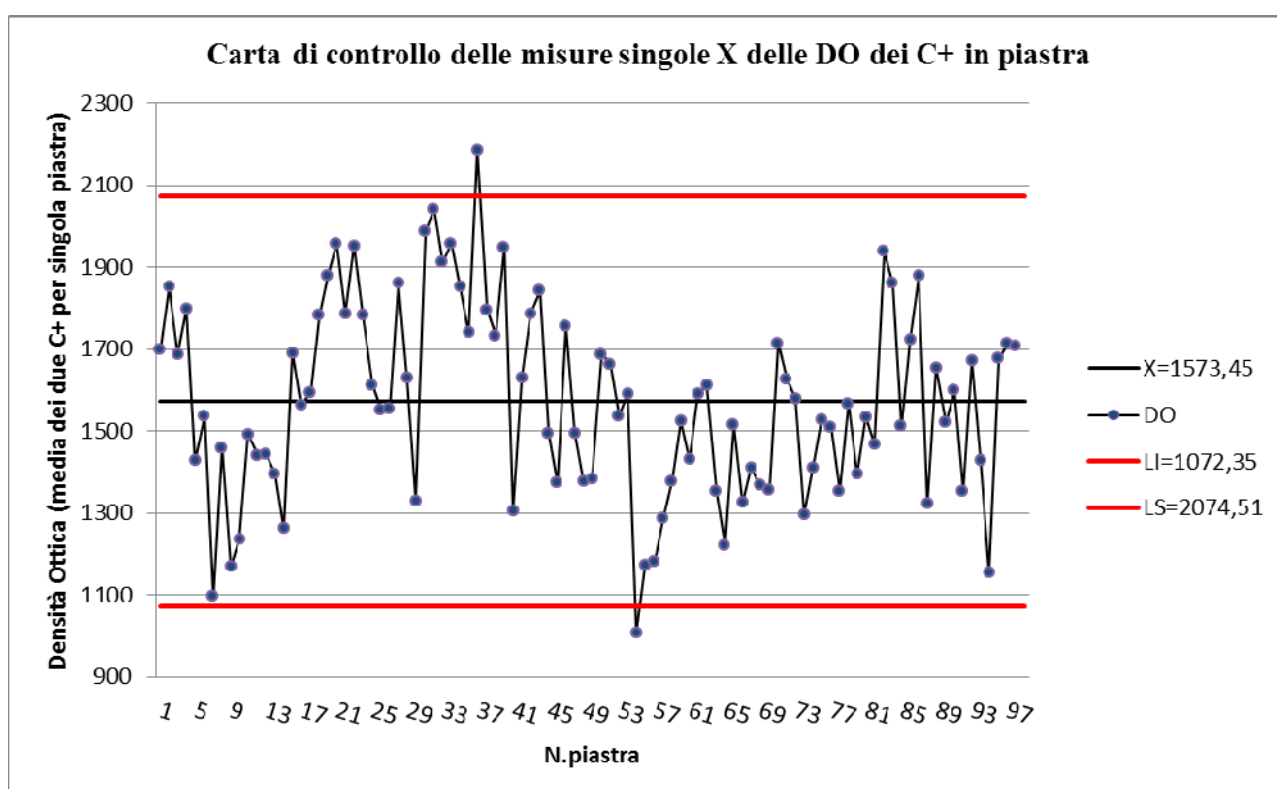
Premessa

In accordo alle indicazioni della ISO 7870-2 relativa alle carte di controllo di Shewhart, nel laboratorio di sierologia della Sezione di Bergamo si utilizzano per i metodi ELISA le seguenti tipologie di carte di controllo per variabili:

1. Carta delle singole osservazioni X
2. Carta delle escursioni mobili ,R

Per entrambe le carte i valori di riferimento non sono assegnati ma stimati da dati storici (minimo 30 osservazioni).

Nelle carte per singole osservazioni X il parametro che viene monitorato è la media delle repliche per singola piastra/sessione di lavoro di C+ e la variabilità casuale della carta è quella osservabile tra piastre. Come si può notare nel seguente grafico, i punti rappresentano le medie delle repliche di DO delle repliche di C+ utilizzate come singole osservazioni e i limiti di accettabilità sono calcolati usando i parametri della tabella 2 della norma ISO 7870-2



I.Z.S.L.E.R.	COSTRUZIONE E COMPILAZIONE DI CARTE DI CONTROLLO DA UTILIZZARE IN SIEROLOGIA PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI NEI METODI ELISA E IN MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI DELLA RT-PCR	IO BG/024 REV. 6 Data emissione 08/02/2019 Pag. 3 di 5
--------------	--	--

In questi casi per misura singola si utilizza la media delle due repliche di C+ o C- presenti in una singola piastra. In accordo a quanto indicato nella norma ISO 7870-2, in presenza di sottogruppi omogeni la media dei valori può essere utilizzata per la costruzione di carte per singole osservazioni. Nella fattispecie delle osservazioni per singola piastra i valori di DO delle repliche di C+ si possono ritenere omogenee. Per definire se un sistema è in stato di controllo statistico alle carte di per singole misure \bar{X} è necessario affiancare le carte di controllo delle escursioni mobili R , che riportano la differenza assoluta tra i valori osservati nelle singole sessioni (piastre).

Modalità operative per la costruzione della carte di controllo.

Per ogni metodo ELISA si raccolgono in un foglio di [di calcolo](#) i dati relativi alle DO dei C+ riportando anche una colonna che permetta di registrare un identificativo di piastra.

Si riportano quindi nel piano cartesiano definito in ordinata dai valori di DO dei C+ e in ascisse dal numero di sessione/piastra, un punto per ogni valore medio delle due osservazioni per piastra di DO di C+ o C-. I limiti di accettabilità si ricavano con le seguenti formule (tabella 2) e i coefficienti E_2, D_4 e D_3 si ricavano dalla tabella 3 di pagina 10 della norma ISO 7870-2 per $n=2$.

Grandezza statistica	Linea centrale	Limiti superiore e inferiore
Osservazione, \bar{X}	\bar{X}	$\bar{X} \pm 2.660 \bar{R}$
Escursione mobile, R	\bar{R}	$3.267 \bar{R}, 0$

Per la carta delle escursioni mobili nel piano cartesiano si inseriscono i valori derivanti dalla differenza assoluta tra il valore medio di DO di C+ o C- delle due repliche di una piastra e quello ottenuto dalla precedente piastra (si assume che l'effetto piastra assorba anche la variabilità dovuta a giorni differenti e operatori differenti). La costruzione delle CC in uso presso il laboratorio è responsabilità dell'AQS

4.3 Compilazione delle carte di controllo

Gli operatori accedono alle CC attraverso [un link protetto fornito dall'AQS mediante comune browser \(Explorer o Chrome\)](#) da cui si accede ad un file formato *.gsheet contenente i fogli di calcolo per la compilazione delle CC (Doc.Corr. IOBG/024 A rev 3 per le CC di sierologia, e Doc.Corr. IOBG/024 C rev 0 per le CC della microbiologia alimenti)

Ad ogni sessione di lavoro, l'operatore che ha eseguito la prova, riporta nella specifica CC i valori delle densità ottiche (DO) o della % di inibizione del C+ delle due repliche così come sono riportati nello stampato dei risultati fornito dal programma per la lettura delle piastre in uso presso il laboratorio, [nelle colonne ct1 e ct2 del foglio di calcolo](#). I valori delle letture dei controlli e dei campioni esaminati sono archiviati in formato digitale in modo elettronico dal programma e possono essere recuperati tramite la funzione 'estrai i controlli' per verificare in ogni momento la correttezza dei valori imputati nelle CC. [I fogli di calcolo sono utilizzati solo per la registrazione dei dati delle DO, non viene effettuato nessun tipo di calcolo.](#)

Le CC sono quindi, prodotte mediante una routine sviluppata in linguaggio R (Appendice A), [sotto forma di una ShinyAPP al link: https://izslerbg.shinyapps.io/CCbergamo/](#). [La routine di R è costituita da i seguenti file: global.R, ui.R, server.R conservati in formato digitale dall'AQS.](#)

L'applicazione è costituita da una barra di navigazione da cui è possibile accedere alle seguenti sezioni: Sierologia, Microbiologia degli alimenti, Validazione.

I.Z.S.L.E.R.	COSTRUZIONE E COMPILAZIONE DI CARTE DI CONTROLLO DA UTILIZZARE IN SIEROLOGIA PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI NEI METODI ELISA E IN MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI DELLA RT-PCR	IO BG/024 REV. 6 Data emissione 08/02/2019 Pag. 4 di 5
--------------	--	---

Nelle prime due sezioni un menù a tendina permette di selezionare la carta di controllo d'interesse, identificate mediante il nome della malattia o acronimo come consuetudine consolidata (es. Brucellosi, IBR siero, ecc) tra quelle disponibili e uno slider, di default impostato sull'anno in corso, permette di selezionare l'anno d'interesse. Nella porzione principale della pagina viene quindi riprodotta la carta di controllo per osservazioni singole X e sotto, quella delle escursioni mobili R. Le carte di controllo possono essere scaricate in formato immagine . E' possibile inoltre interagire con la carta di controllo mediante il mouse per evidenziare i valori associati ad ogni punto o mediante gli strumenti indicati da apposite icone, poste sulla parte superiore del grafico, modificare la scala o selezionare parti d'interesse della carta.

4.4 Valutazione delle CC

Ogni sessione di lavoro a cui fa seguito l'inserimento di nuovi dati che alimentano le CC rappresenta una occasione per valutare lo stato del processo. Si osserva dapprima la carta delle escursioni R o delle escursioni mobili R a seconda del tipo di CC implementata. Se non vi sono osservazioni oltre il limite di accettabilità allora il sistema può essere definito in controllo statistico. In questo caso la dispersione del processo è considerata stabile e quindi le medie \bar{X} , o le singole osservazioni X possono essere analizzate per vedere se la posizione del processo si modifica nel tempo, attraverso la valutazione dei punti fuori controllo, andamenti o tendenze anomali. Una piastra viene invalidata solo ed esclusivamente se i valori dei C+ e/o loro trasformazioni lineari (SP) superano i criteri di validità imposti dal metodo di prova. Le anomalie riscontrabili mediante le CC devono essere prese in considerazione ed eventualmente sottoposte ad analisi per individuare fattori in grado di spiegare le anomalie riscontrate e quindi alla successiva messa in atto di azioni correttive o preventive in grado di riportare/mantenere il processo sotto controllo statistico. L'individuazione dei fattori in grado di spiegare le anomalie consiste in una valutazione fatta collegialmente tra dirigente responsabile del laboratorio e operatori tecnici di tutto il processo di produzione (dall'inizio dell'analisi alla fine). Per favorire questo processo di analisi per ogni CC implementata oltre ai dati che alimentano la carta si procede durante la compilazione delle CC alla registrazione anche delle seguenti variabili:

1. Operatore che ha eseguito l'analisi
2. Data esecuzione analisi
3. Lotto del kit in uso

Queste informazioni dovrebbero facilitare in sede di analisi l'individuazione dei fattori in grado di spiegare le anomalie del processo restringendo il campo di valutazione.

A seguito della valutazione dell'andamento dei punti della CC si interviene attraverso l'analisi su indicata nel caso di :

- tre punti successivi oltre i limiti superiore o inferiore
- dieci punti successivi sopra o sotto la linea centrale con andamento decrescente o crescente

4.5 Validazione

La validazione della routine di R per la produzione delle CC di controllo avviene attraverso l'implementazione dei dati per la costruzione di CC per singole osservazioni e per escursioni mobili presenti nel paragrafo A.3.3 , pag 30-31 della ISO 7870-2:2013.. La validazione avviene attraverso la verifica che i limiti calcolati dalla routine R delle carte di controllo per singole osservazioni e per escursioni mobili corrispondono ai valori riportati sulla norma ISO. La verifica [della validità è formalizzata nella sezione "Validazione" dell'applicazione sopra descritta.](#)

5. RIFERIMENTI

ISO 7870-2 – Control charts Part2: Shewart control charts

6. ALLEGATI

I.Z.S.L.E.R.	COSTRUZIONE E COMPILAZIONE DI CARTE DI CONTROLLO DA UTILIZZARE IN SIEROLOGIA PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI NEI METODI ELISA E IN MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI PER IL MONITORAGGIO DEI CONTROLLI DELLA RT-PCR	IO BG/024 REV. 6 Data emissione 08/02/2019 Pag. 5 di 5
--------------	---	---

Nessuno

7. DOCUMENTI CORRELATI

Doc.Corr. IOBG/024 A rev 3

Doc.Corr.IOBG/024 C rev.0