

Prima di iniziare...

# QUIZ 1

Il laboratorio di biochimica  
clinica



# Il laboratorio verso una nuova era

Medical Procedure

Individual

# Personalized Medicine



Tailored  
Treatment

Testing

Disease

Therapies

Genome

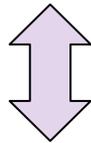
Analysis

Different



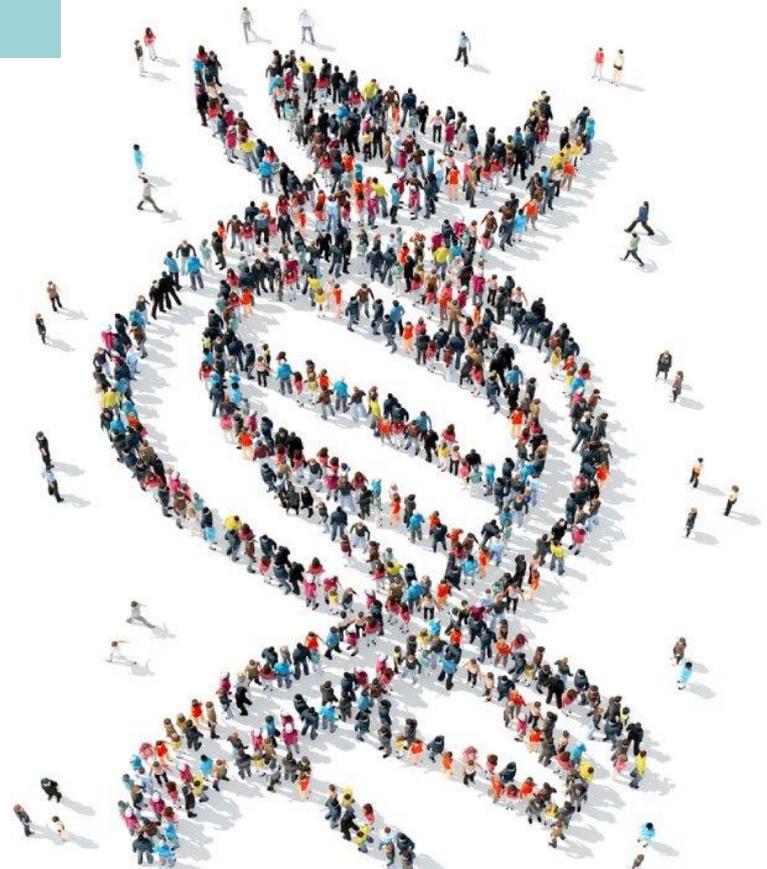
# E' piu' importante sapere che tipo di persona abbia una malattia che sapere che tipo di malattia abbia una persona (Ippocrate 460-370 a.c.)

*Il tentativo di personalizzare il più possibile prevenzione, diagnosi e cure in base al singolo paziente.*



**Medicina personalizzata:** un insieme di strategie di prevenzione e trattamento che tiene conto delle caratteristiche che rendono ogni individuo unico: dati genetici integrati con informazioni riconducibili alla persona, quali il contesto ambientale, il comportamento e lo stile di vita.

**Medicina  
personalizzata**



## Senza medicina personalizzata

Alcuni traggono benefici dalla cura e altri no



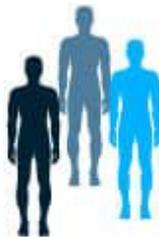
Pazienti



Terapia



Benefici



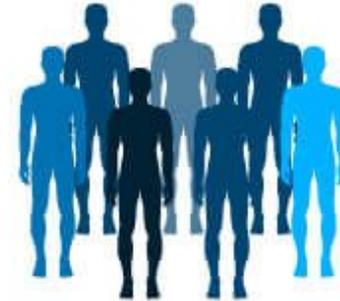
Nessun beneficio



Effetti avversi

## Con la medicina personalizzata

Ogni paziente riceve il farmaco più adatto



Pazienti



Test farmacogenetici



Terapie differenziate



Ogni paziente trae benefici dal trattamento individualizzato

**Medicina di precisione:** un approccio al trattamento e alla prevenzione delle malattie che tiene conto della variabilità delle caratteristiche genetiche di ogni individuo, identificando i meccanismi specifici alla base dell'insorgenza della patologia, favorendo l'ottimizzazione delle scelte terapeutiche.

## Qual è dunque la differenza fra medicina di precisione e medicina di personalizzata?

In estrema sintesi, la differenza tra medicina di precisione e medicina personalizzata consiste, dunque, nel fatto che la prima studia la patologia e i meccanismi fondamentali che generano la sua insorgenza. La seconda studia il paziente integrando le sue caratteristiche genetiche con informazioni su storia clinica, abitudini, ambiente in cui vive e stile di vita.



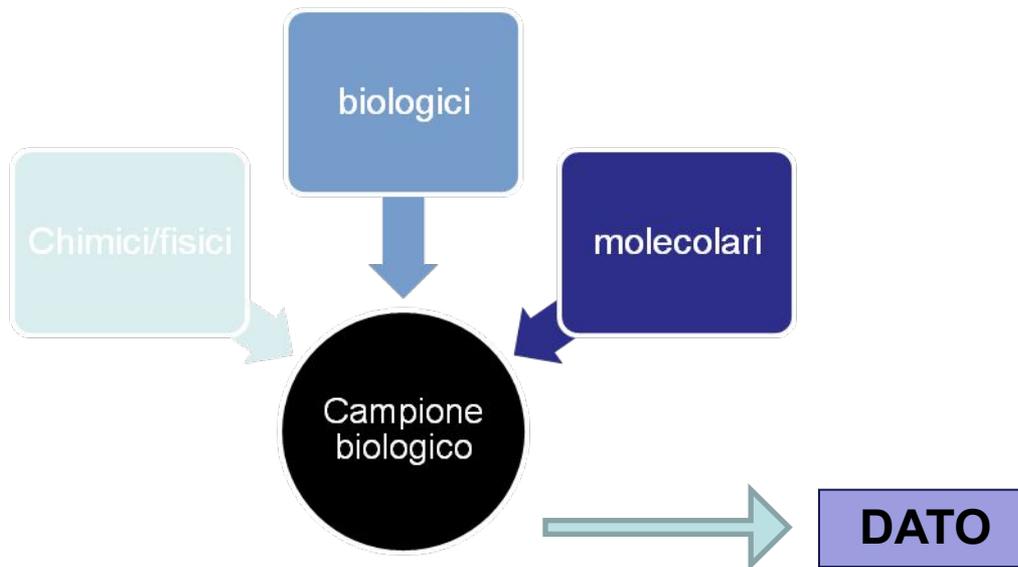
**Medicina di  
precisione**



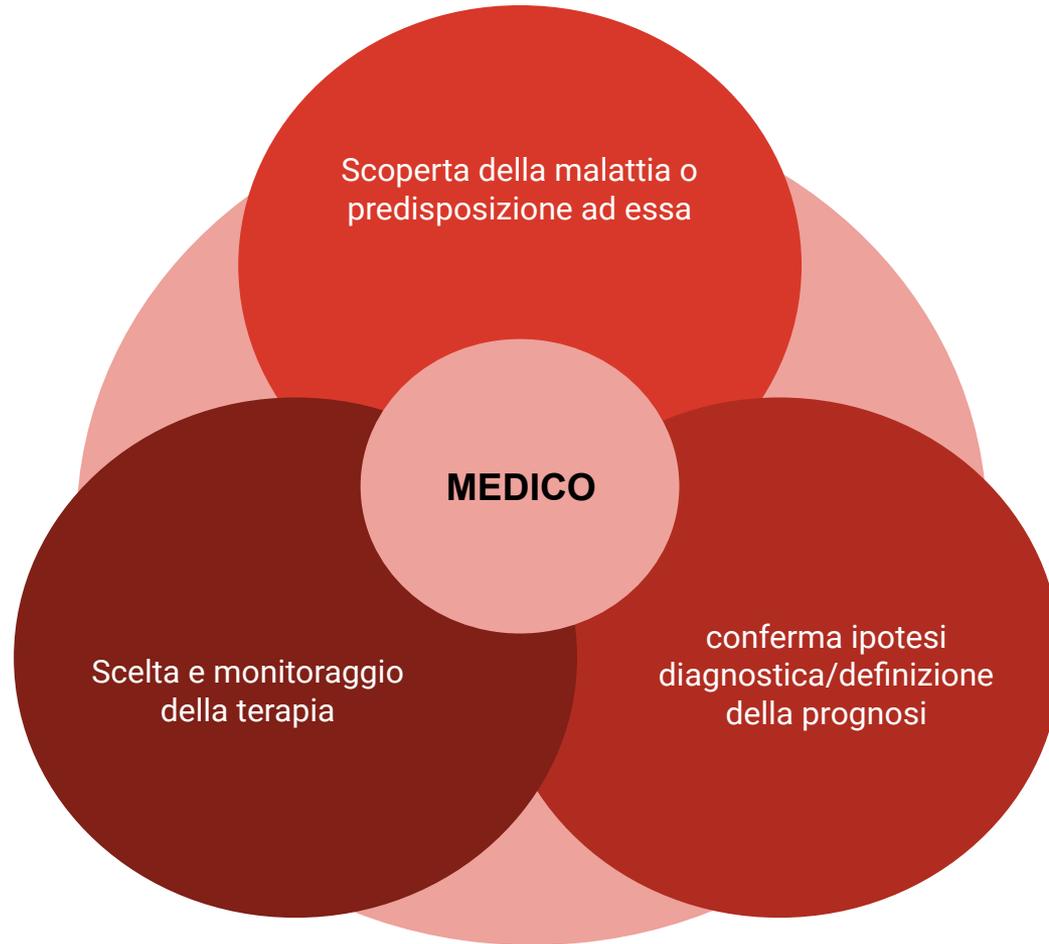
**Medicina  
personalizzata**

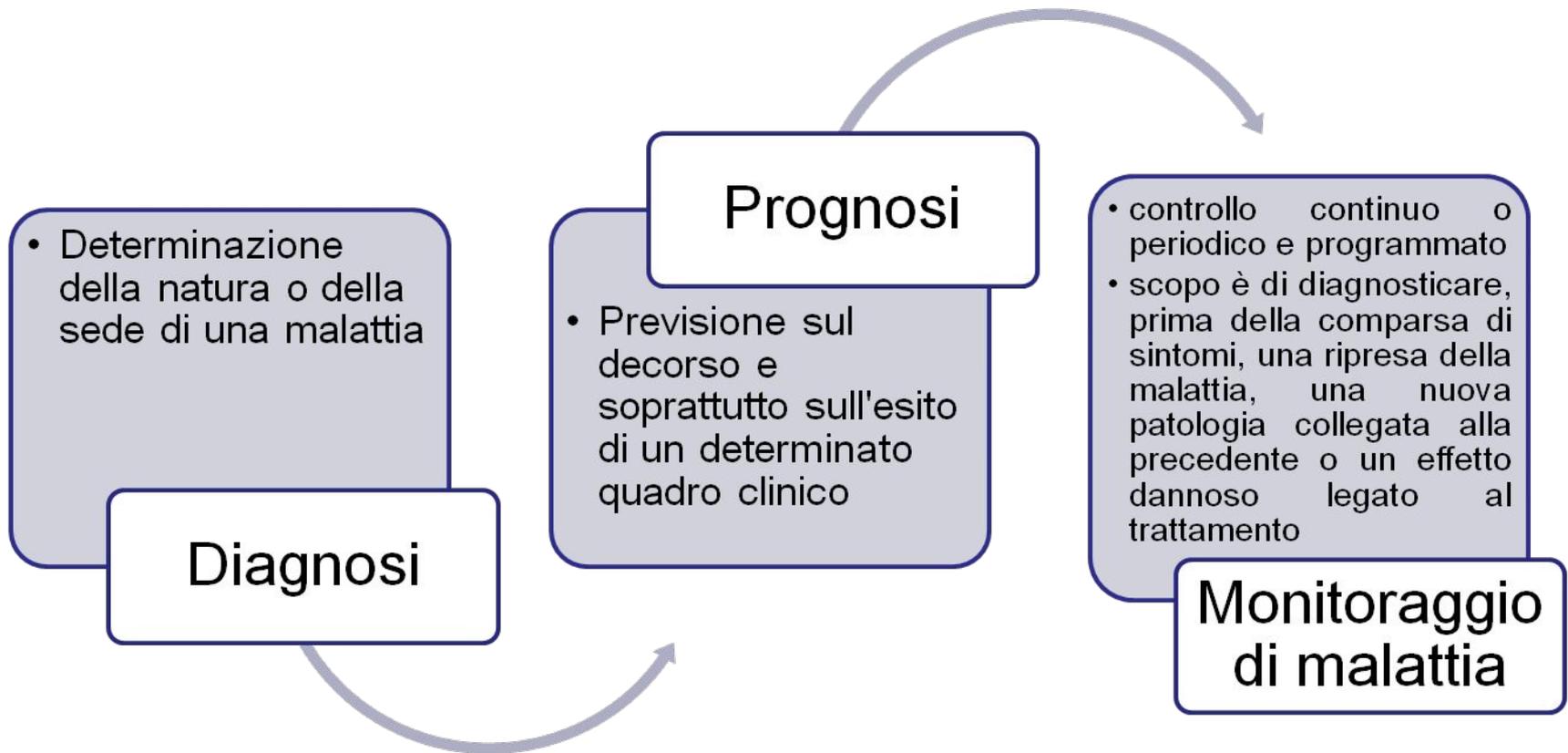
# Biochimica clinica

Studia con metodi chimici, fisici, biologici e molecolari le alterazioni dell'organismo nello stato di malattia ricavando da campioni biologici provenienti dal paziente dati qualitativi o quantitativi, che consentano al clinico di ottenere informazioni utili a scopo preventivo, diagnostico, terapeutico o riabilitativo



# Ruolo della Biochimica clinica





Un esame di laboratorio deve essere richiesto se:

- è di utilità al paziente
- è di utilità al medico
- è di utilità alla collettività

# Esami richiesti a vantaggio del paziente

- A scopo diagnostico;
- A scopo prognostico;
- Per lo staging/monitoraggio della malattia;
- Per indicare se è presente una malattia allo stadio subclinico in una persona apparentemente sana;
- Per il controllo sia degli effetti dei farmaci e la regolazione della posologia, sia dei livelli dei farmaci in circolo;
- Per la consulenza genetica;
- Per i controlli di precedenti test di laboratorio i cui risultati cadono nella cosiddetta “zona grigia”;

# Esami richiesti a vantaggio del paziente

- Per istituire un trattamento immediato a favore di un paziente in pericolo di vita;
- Prima di attuare un trattamento generale, per esempio un intervento operatorio, al fine di valutare alcune funzioni generali importanti per il buon esito dell'intervento (per es. la funzione emocoagulativa); per saggiare alcune situazioni biometaboliche che possono venire alterate dall'intervento stesso; per controllare l'assenza di deficit genetici che potrebbero essere di pregiudizio durante il trattamento anestetico

# Esami richiesti a vantaggio della professione medica

- A scopo medico-legale;
- A scopo conoscitivo;
- Per la ricerca biomedica;
- Per la didattica

# Esami richiesti a vantaggio della collettività

- Per l'adozione di misure preventive;
- Per ricerche epidemiologiche di tipo longitudinale o trasversale;
- Per motivi di politica sanitaria

# ESAMI DI SCREENING



Si effettuano di solito su pazienti asintomatici o con sospetta diagnosi presintomatica per affezioni reali o possibili o vantaggiose

Utilità: persone a rischio per certe patologie legate a problemi principalmente di ordine sessuale e professionale

# Le matrici/sistemi oggetto di esame

## Tali sistemi sono:

- Il sangue (siero e plasma);
- L'urina;
- Il liquido cefalo-rachidiano;
- Il liquido seminale;
- Il liquido amniotico;
- Le feci;
- L'escreato;
- I succhi gastrico o duodenale;
- Il sudore;
- I frammenti di tessuto bioptico

# Campioni

- ❑ I liquidi o tessuti prelevati dal paziente sono definiti campioni e su questi il laboratorio esegue il dosaggio dei vari costituenti, o analiti, secondo la richiesta che perviene dal clinico
- ❑ Le caratteristiche unificanti delle indagini di laboratorio sono, quindi, relative al materiale biologico esaminato (proveniente dal paziente) oltre alle finalità del risultato del test, che deve risultare di beneficio diretto o indiretto per il paziente sul piano preventivo, diagnostico o terapeutico

## Il sangue, tessuto essenziale per la vita dell'uomo

Il sangue è l'intermediario indispensabile tra le cellule del nostro corpo e l'ambiente che ci circonda (ambiente in cui si trova anche il nostro nutrimento).

Esso infatti reca alle cellule le sostanze alimentari e l'ossigeno, ed inoltre elimina le sostanze di rifiuto prodottesi nell'organismo.

Circola in un sistema di canali o vasi, distinti in arterie, vene e capillari, sospinto dal cuore, che funziona come una pompa aspirante e premente.

La scoperta della **circolazione del sangue** va attribuita ad un Italiano, **Andrea Cesalpino** di Arezzo.

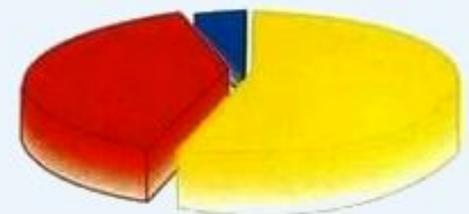
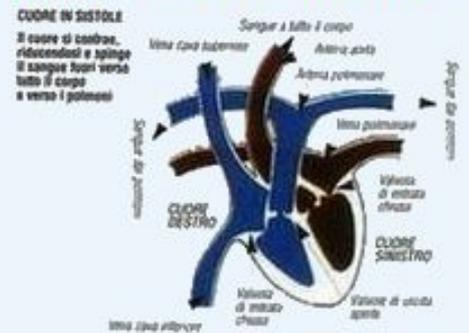
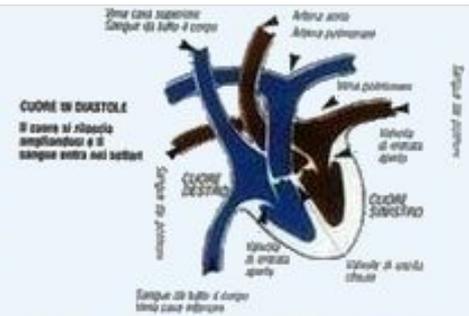
Nel 1593 egli diede una completa descrizione della circolazione del sangue nelle arterie e nelle vene, dimostrando il loro collegamento con i capillari.

## La composizione del sangue

Il sangue è un tessuto composto per il 55% da una sostanza liquida chiamata **plasma**, e per il restante 45% da 3 specie di elementi cellulari:

- i globuli rossi;
- i globuli bianchi;
- le piastrine.

Il sangue si distingue in Arterioso e Venoso; quello **arterioso** è di colore **rosso vivo**, quello **venoso** è di colore **rosso cupo** e carico di anidride carbonica.



- Plasma 55%
- Globuli Bianchi e Piastrine 5%
- Globuli Rossi 40%

## I globuli rossi

Nell'uomo sono da 4·500·000 a 5·800·000 per  $\text{mm}^3$  e nella donna da 4·000·000 a 5·200·000 per  $\text{mm}^3$ .

Dall'aria inalata nei polmoni assorbono l'ossigeno che trasportano in tutto il corpo cedendolo alle cellule, anche le più lontane; viceversa trasportano ai polmoni l'anidride carbonica, prodotta dall'attività delle cellule del corpo.

I globuli rossi sono prodotti dal midollo rosso delle ossa: circa **un trilione al giorno!**

Essi vivono mediamente 120 giorni. Quando diventano "vecchi" vengono distrutti nella milza e nel fegato.

Il calo del loro numero o il venir meno di alcune loro componenti, quali il ferro, causa l'**anemia**.



[Torna all'indice](#)

## I globuli bianchi



Sono da 4·500 a 10·500 per  $\text{mm}^3$ , e appaiono al microscopio incolori e trasparenti.

Hanno la proprietà di spostarsi, deformarsi, di attraversare le pareti dei capillari e di penetrare negli interstizi dei tessuti.

Hanno il compito di assimilare e di distruggere i batteri o altri corpuscoli estranei e dannosi all'organismo.

Un particolare tipo di globuli bianchi, i **linfociti**, programmano la produzione e fabbricano direttamente gli anticorpi contro le malattie.

Rappresentano quindi il più valido mezzo di difesa dell'organismo contro virus e batteri.

Vengono fabbricati dalla milza, dalle ghiandole linfatiche e dal midollo osseo.

## Le piastrine

Sono dei frammenti di cellule prodotte dal midollo rosso delle ossa ed in media sono da 150·000 a 400·000 per mm<sup>3</sup>.

Le piastrine hanno parte attiva nell'importante fenomeno della coagulazione del sangue in caso di ferite.

Vivono pochi giorni, in media 10.



### Procedure generali per l'esecuzione del prelievo di sangue

1. Standardizzazione dell'ora del prelievo (7-9 am) per i metaboliti senza ritmo circadiano o definizione di un'ora correlata al ritmo per quelli che lo dimostrano
2. Paziente perfettamente a riposo e seduto o supino; deve aver mantenuto questa posizione per almeno 15-20 minuti prima del prelievo di sangue. Il luogo del prelievo deve essere facilmente accessibile senza sforzo fisico da parte del paziente.
3. Paziente a digiuno dalla sera precedente per alcuni analiti
4. Il paziente deve aver praticato una dieta regolare nei giorni precedenti, non deve aver assunto alcol, il fumo va proscritto o segnalato e registrato.

# Plasma o siero

Il **sangue** (intero) è un tessuto biologicamente attivo che ha il compito principale di trasportare le sostanze in ogni angolo del nostro corpo. Il sangue rappresenta circa l'8 percento del peso corporeo (nei maschi il volume medio è di 5-6 litri) ed è composto da due parti:

- **parte cellulare** (elementi corpuscolati o figurati, anche chiamato "ematocrito"): globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, il 45% del sangue;
- **parte liquida** (plasma), il 55% del sangue.

Il **plasma**  
rappresenta la  
componente liquida  
del sangue

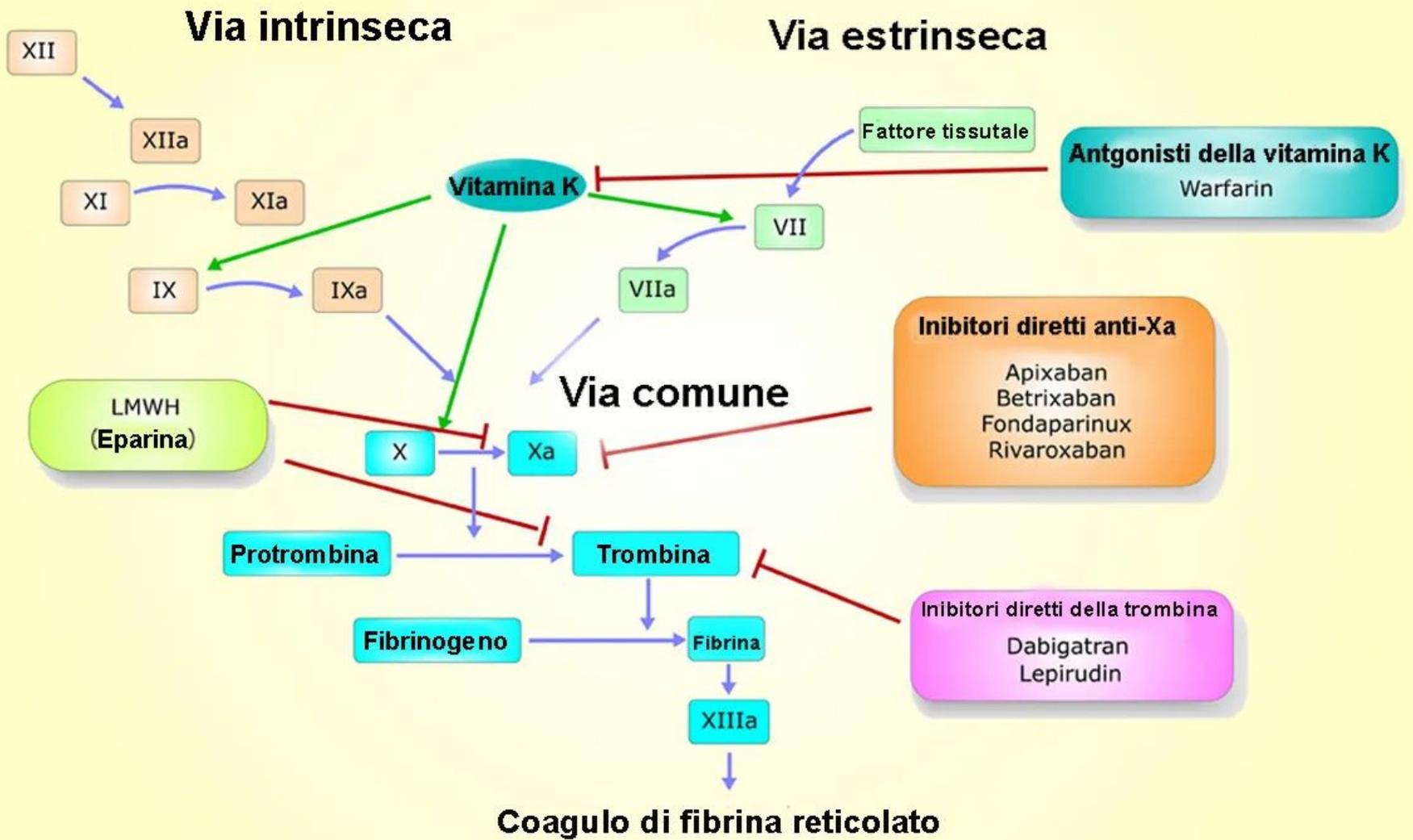
Il **siero** è plasma  
privo  
di **fibrinogeno**,  
**fattore VIII**, **fattore**  
**V** e **protrombina**.

### Differenze tra plasma e siero nella concentrazione di alcuni analiti

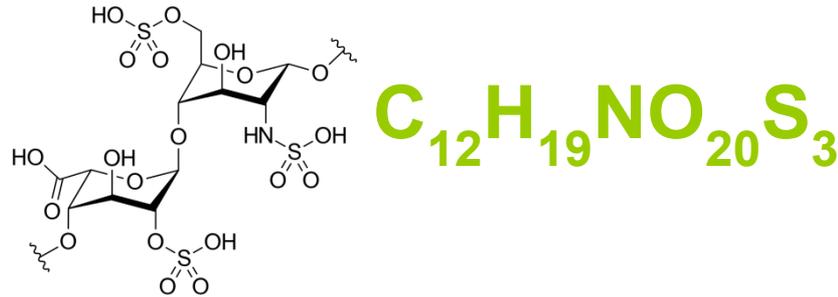
Plasma vs siero	%	Plasma vs siero	%
Calcio	+0,9	Aspartato Aminotrasferasi AST	-0,9
Cloruro	+0,2	Creatinina Chinasi	-2,1
Proteine totali	+4	Glucosio	-5,1
Bilirubina	=	Fosforo	-7
Colesterolo	=	Potassio	-8,4
Creatinina	=	Sodio	-0,1
Albumina	-1,3	Urea	-0,6
Fosfatasi Alcalina ALP	-1,6	Urato	-0,2

	<p><b>Rosso (per urgenze)</b> <b>Giallo</b> Senza anticoagulante Con gel separatore</p>	<p><b>Siero:</b> biochimica, immunologia, farmacotossicologia, sierologia batterica e virale</p>
	<p><b>Tappo Grigio</b> Con KF + Na<sub>2</sub> EDTA  Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo</p>	<p><b>Plasma:</b> curve glicemiche – acido lattico</p>
	<p><b>Tappo Nero</b> Con anticoagulante K2 EDTA  Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo</p>	<p><b>Sangue intero:</b> emocromi, G-6-PDH, emoglobina glicata</p>
	<p><b>Tappo Viola - Provetta lunga</b> Con anticoagulante K3 EDTA  Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo</p>	<p><b>Plasma:</b> PTH, ciclosporina, Renina attiva, ACTH (Prel.a freddo) Tacrolimus e omocisteina (Prel.a freddo), BNP <b>Sangue intero:</b> Cromatografia Hb, ammonio, tipizzazioni linfocitarie</p>
	<p><b>Tappo Arancio</b> Con anticoagulante Litio Eparina  Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo</p>	<p><b>Plasma:</b> marcatori cardiaci (CK-MB, troponina I)</p>
	<p><b>Provetta Bianca</b> Con anticoagulante K2 EDTA + gel  Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo. La provetta deve essere recapitata in Laboratorio entro 2 ore dal prelievo</p>	<p><b>Plasma:</b> rivelazione antigeni batterici e/o virali con metodica PCR</p>
	<p><b>Tappo Celeste</b> Con anticoagulante Na - citrato 9NC 3.2% (0.109M) Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo</p>	<p><b>Plasma:</b> coagulazione</p>

	<p><b>Tappo Verde</b> Nota importante Con anticoagulante Litio Eparina Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo</p>	<p><b>Plasma:</b> biochimica in emergenza, osmolarità plasmatica; catecolamine plasmatiche (prel.a freddo)</p>
	<p><b>Tappo Rosso – Provetta da 7ml</b> Senza anticoagulante Senza separatore</p>	<p><b>Chimica clinica:</b> es. chimico fisico del Liquor Crioglobuline prelievo e recapito della provetta a 37 °C <b>U.O. Microbiologia:</b> esami batteriologici sul Liquor</p>
	<p><b>Provetta urine tappo bianco</b></p>	<p>Esame completo urine</p>
	<p><b>Provetta Urine tappo blu</b></p>	<p>Dosaggi urinari chimica clinica e tossicologici Test di gravidanza Lisozima urinario</p>



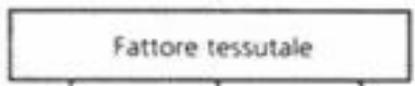
# Anticoagulanti



- **Eparina:** E' un glicosaminoglicano altamente solfatato.
- Presente a bassi livelli di concentrazione nel sangue e nei tessuti. Si trova in commercio come sale di sodio, di potassio, di ammonio e di litio.
- Agisce con attività antitrombinica. L'effetto anticoagulante è più evidente e si esplica in presenza di un cofattore plasmatico: l'antitrombina III (α-globulina) al cui radicale lisinico l'eparina si lega, formando un complesso in grado di accelerare le reazioni di neutralizzazione di diversi fattori quali: XIIa, XIa, IXa, Xa, IIa, XIIIa, callicreina. Ciò impedisce la formazione di trombina e quindi di fibrina.

(1)

Trauma tessutale



(2)

VII



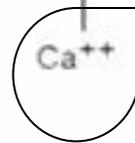
VIIa



X



Fattore X attivato



(3)

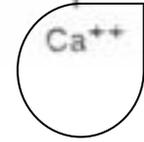
Ca<sup>++</sup>

V

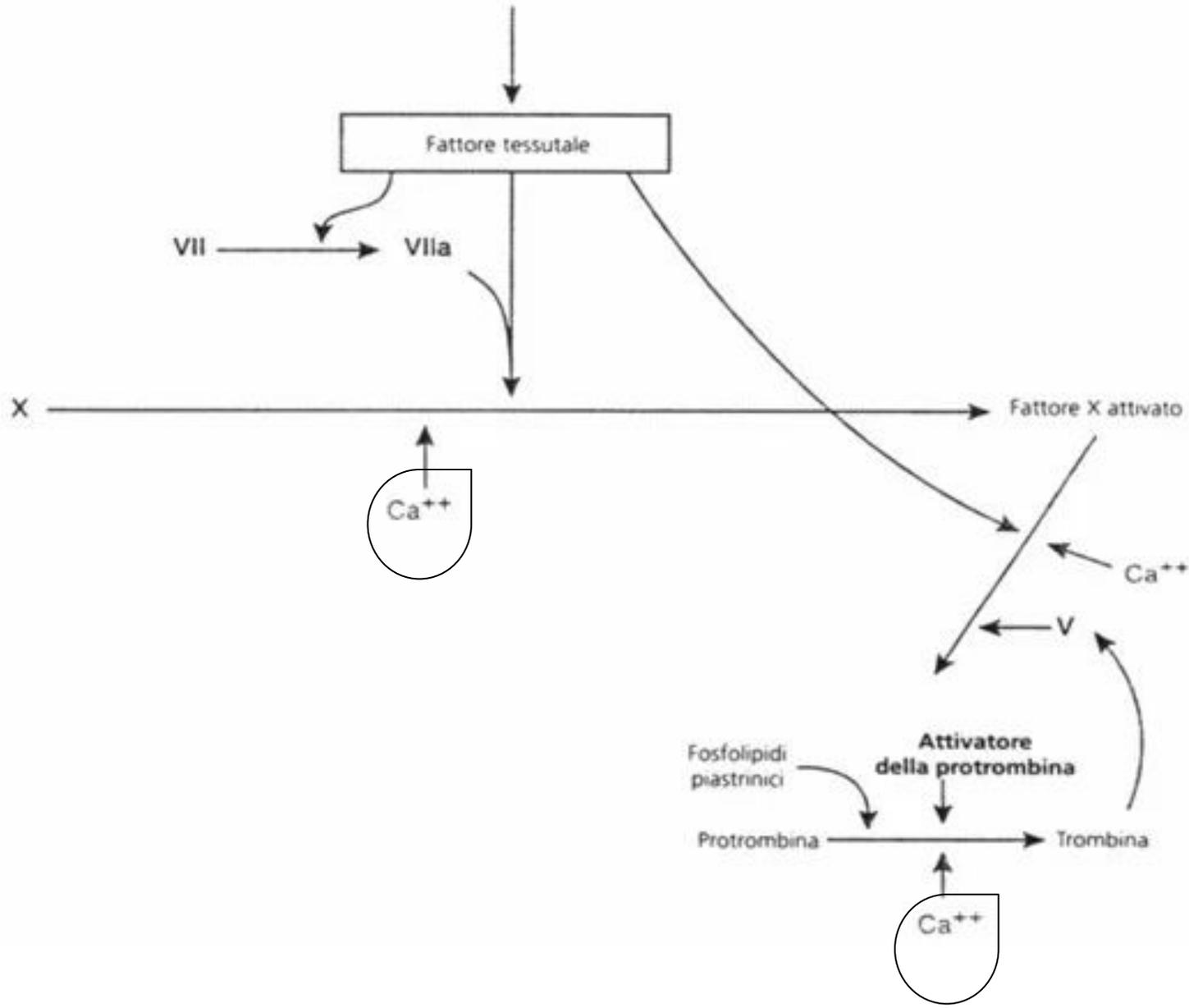
Fosfolipidi  
piastrinici

Attivatore  
della protrombina

Protrombina

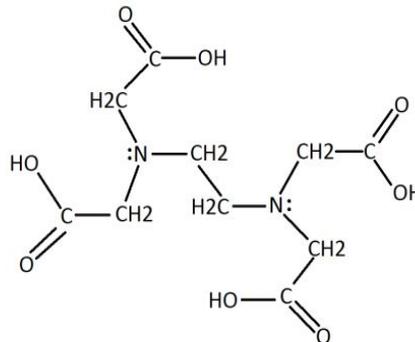


Trombina



# Anticoagulanti

- **Ossalato** (sale di sodio, potassio, ammonio e litio): esplica effetto anticoagulante attraverso la formazione di complessi poco solubili con gli ioni calcio.
- **EDTA** (acido etilendiaminotetraacetico sale bi o tripotassico oppure bisodico): è un agente chelante che agisce per complessazione e conseguente rimozione degli ioni calcio.



# Anticoagulanti

- **Citrato** (sale sodico): ha azione complessante sugli ioni calcio. Viene raramente usato in ematochimica, più frequentemente in ematologia dove costituisce l'anticoagulante di scelta per gli studi sulla coagulazione e per la velocità di eritrosedimentazione.
- **Fluoruro** (il sale più usato è quello di potassio per la maggiore solubilità): esplica azione competitiva con il calcio plasmatico e come tale manifesta una debole azione anticoagulante, tanto che, per essere efficace, deve venir usato alla concentrazione di 6-10 mg/ml. In queste condizioni però produce emolisi e scambi osmotici di acqua tra globuli e plasma.

# Anticoagulanti usati per i test

<b>Sostanze anticoagulanti</b>	<b>Test per cui è indicata</b>	<b>Test in cui interferisce</b>
<b><u>Litio eparina</u></b>	Na,K,bicarbonati,cloruri	NH <sub>3</sub> , Ca, colesterolo, insulina, biologia molecolare
<b><u>Sodio eparina</u></b>	Emocromocitometrico, Enzimi plasmatici,emoglobina	biologia molecolare
<b><u>EDTA, sale bisodico o potassico</u></b>	Emocromocitom,fibrinogeno,e moglobine patologiche	Ca,colesterolo,CO <sub>2</sub> ,CK,Fe,L AP,K,NA,prot tot,VES
<b><u>Fluoruro</u></b>	Glucosio	NH <sub>3</sub> ,Ca,amilasi,cloruri,K,Na ,urea,CO <sub>2</sub>
<b><u>Citrato di Na tribasico</u></b>	Tempo di protrombina	Ca,fosfati,NEFA,Na,trigliceridi
<b><u>Ossalato di K</u></b>	Emocoagulazione Fibrinogeno	NH <sub>3</sub> ,Ca,CO <sub>2</sub> ,LDH,fosfati,insulina,VES,PTT

# Raccolta delle urine

Il campione di urina può essere raccolto secondo distinte modalità in relazione al tipo di indagine da eseguire, all'età ed allo stato del paziente.



Raccolta del primo mattino: è il campione idoneo per l'esame "standard" fisico, chimico e microscopico delle urine: l'urina è più concentrata, quindi sono più evidenti eventuali alterazioni. Si utilizza un recipiente monouso di capacità variabile (a seconda dei test da eseguire) e sterile per le indagini colturali.

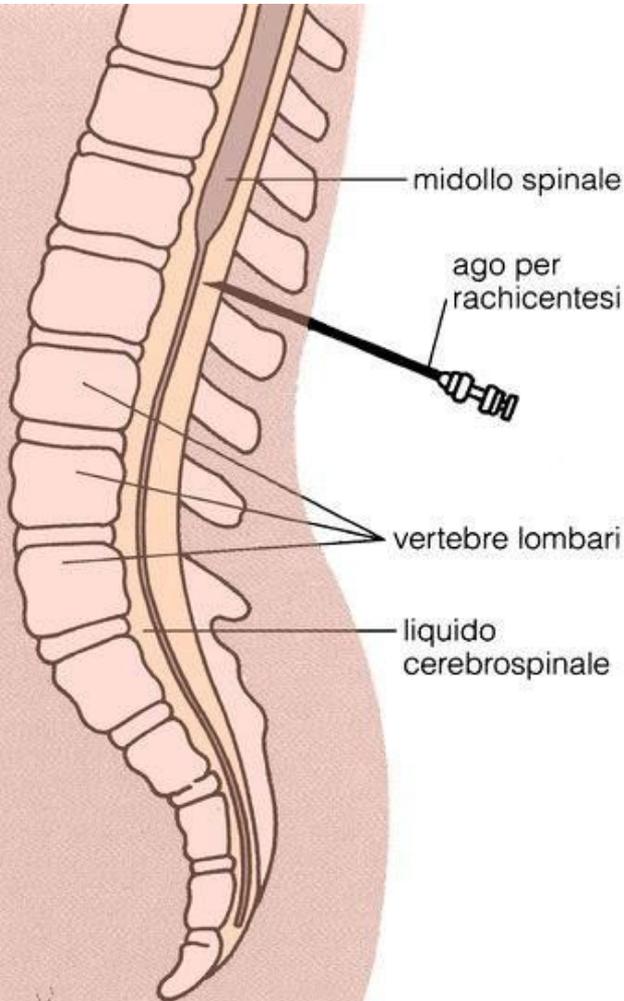


Raccolta temporizzata o delle 24 ore è la modalità di campionamento ideale per gli studi di clearance, se devono essere dosate sostanze escrete con ritmi variabili durante il giorno, quando è necessario aumentare l'accuratezza di misura per sostanze presenti in concentrazione ridotta.

# Liquor cefalorachidiano (LCR)

- Il liquor o liquido cefalorachidiano è un liquido incolore e limpido (come l'acqua) che scorre intorno all'encefalo ed al midollo spinale sorreggendoli e proteggendoli. L'analisi del LCR comprende una serie di test necessari alla valutazione dell'aspetto e alla misura delle sostanze in esso presenti, al fine di diagnosticare varie possibili patologie/condizioni a carico del sistema nervoso centrale.
- Il liquor è formato e secreto dai plessi coroidei, uno speciale tessuto ricco di vasi sanguigni che riveste le piccole cavità o camere (ventricoli cerebrali) che si trovano all'interno del cervello. Esso viene continuamente prodotto, quindi circola e viene riassorbito nel sangue.
- **Quantità:** Il volume totale del liquor è compreso tra i 90 e i 150 ml negli adulti, e tra 10 e 60 ml nei neonati. Questo liquido, prodotto in modo costante dai plessi coroidei, circola nel sistema nervoso centrale e viene riassorbito dal sangue.
- **Pressione liquorale:** variabile da soggetto a soggetto ed è modificata in modo determinante dalla postura.
- **Aspetto:** incolore, limpido e senza tracce di sangue (cosiddetto aspetto di acqua di roccia).

# Liquor cefalorachidiano



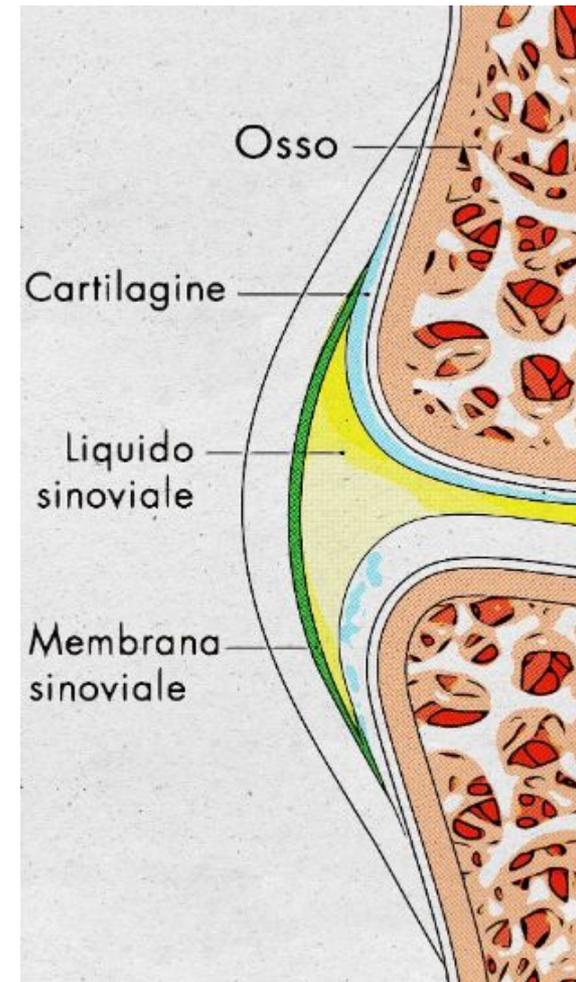
- **Modalità e sede di prelievo:** L'intestino e la vescica dovrebbero essere svuotati prima della procedura. Occorre assumere la posizione fetale durante il prelievo e, successivamente, rimanere distesi per un certo periodo di tempo (circa un paio d'ore). Il prelievo può essere effettuato, anche, con il paziente in posizione seduta con il busto flesso in avanti. Il LCR viene raccolto mediante puntura lombare nello spazio intervertebrale compreso tra la quarta e la quinta vertebra lombare.
- La scelta della posizione del paziente influenza i valori della pressione liquorale, che risulta più alta nella posizione seduta.

# Liquido sinoviale

- Il liquido sinoviale è un fluido lubrificante presente in piccole quantità al livello articolare, dove viene prodotto e contenuto grazie alle membrane sinoviali. Il liquido sinoviale svolge un ruolo di protezione nei confronti delle estremità delle ossa riducendo la frizione delle articolazioni durante il movimento, in particolare nelle articolazioni delle ginocchia, spalle, fianchi, mani e piedi.

È privo di proteine ad alto peso molecolare, ma contiene ialuroproteine. Ha funzione lubrificante e nutritiva nei confronti delle cartilagini che rivestono i capi articolari delle ossa.

- **Indicazioni:** indagini di laboratorio mirate ad approfondire e trattare le alterazioni delle articolazioni.



# Liquido sinoviale

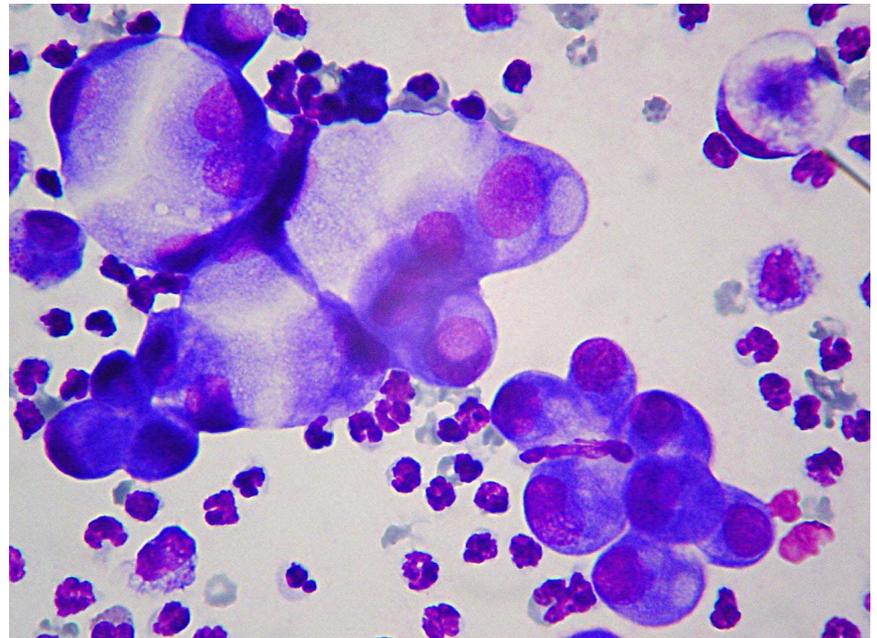
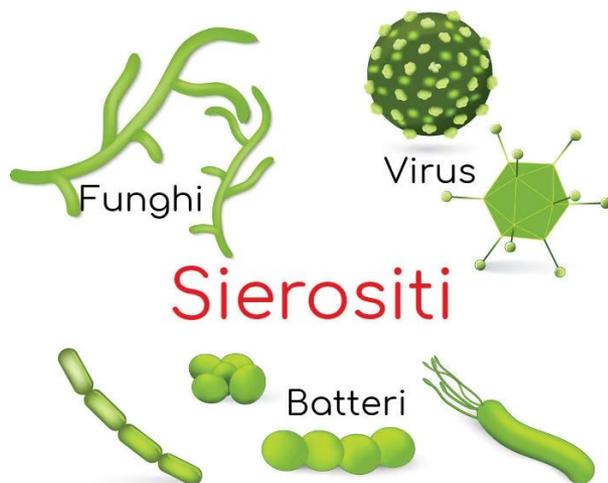
- **Modalità di prelievo:** artrocentesi, aspirazione in siringa sterile.
- **Provette:** differenti a seconda del tipo di indagini da eseguire
  - con eparina: per indagini di microbiologia;
  - senza anticoagulante: per indagini di chimica clinica ed immunologia;
  - con EDTA: per indagini cito-ematologiche.

**Precauzioni:** è necessario impedire la naturale tendenza del fluido sinoviale a coagulare, dato l'alto contenuto in mucopolisaccaridi acidi (acido ialuronico e proteine).

# Liquidi di versamento delle cavità sierose

Le cavità sierose (pleurica, pericardica e peritoneale) contengono un fluido simile al siero per colore e caratteristiche chimico-fisiche, che si forma continuamente per ultrafiltrazione del plasma e viene riassorbito attraverso i capillari delle sierose, in modo che la quantità e la composizione restino costanti.

- Prelievo a scopo terapeutico: per evitare la compressione degli organi endocavitari si effettua lo svuotamento per aspirazione mediante puntura cutanea.
- Prelievo a scopo diagnostico



# L'Amniocentesi

È il prelievo transaddominale di 20-30 ml di liquido amniotico (con AGO 20-22G).

- Si esegue a partire dalla 14a settimana di gravidanza: se eseguita prima della XIV settimana aumenta il rischio di deformità fetali e di fallimento della procedura e di aborto (amnios e corion non sono ancora fusi).
- Comporta un rischio di aborto dell'1%, dipendente dalla manualità dell'operatore.
- Per le analisi citogenetiche o biochimiche è necessario usare provette sterili di materiale plastico per evitare che le cellule aderiscano alle pareti e non siano più recuperabili.

# Liquido amniotico

- Il liquido amniotico protegge e nutre il feto durante la gravidanza, perciò da esso è possibile valutare, mediante vari tipi di analisi, lo stato di salute/malattia del feto stesso.
- Il liquido amniotico mantiene una temperatura stabile, permette al feto di muoversi abbastanza liberamente nell'utero ed evita la compressione del cordone ombelicale. Esso è contenuto nel sacco vitellino e presenta un aspetto dall'acquoso al giallo opalescente; è ricco di proteine, nutrienti, ormoni e anticorpi.
- Il liquido amniotico inizia a formarsi una o due settimane dopo il concepimento e aumenta di volume fino alla trentaseiesima settimana circa. Il liquido viene continuamente assorbito e rinnovato.
- Il feto inghiotte e inala il liquido amniotico e lo rilascia nelle urine. Pertanto nel liquido amniotico è possibile trovare cellule e sostanze di vario genere di origine fetale, che possono essere analizzate per valutare lo stato di salute del feto stesso.

# Liquido amniotico

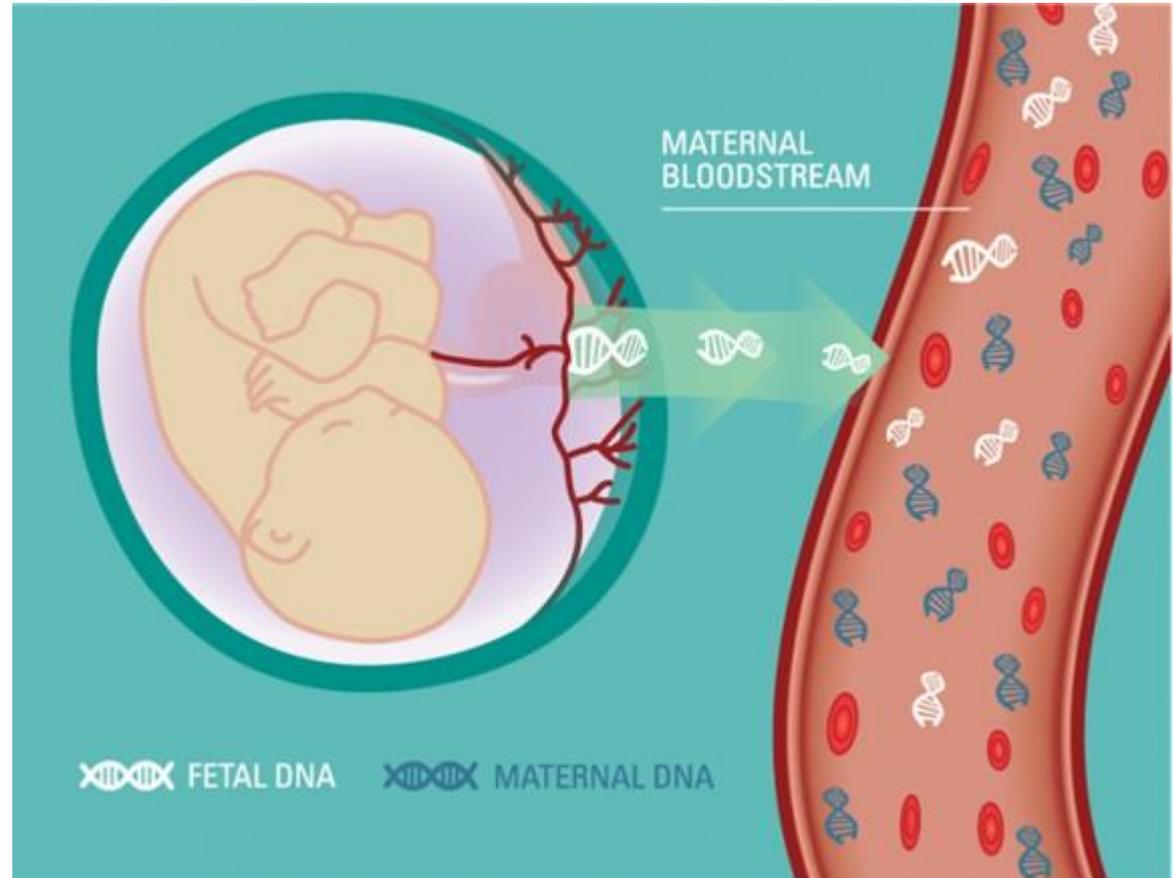
**L'analisi del liquido amniotico consente di evidenziare:**

- alterazioni cromosomiche (dopo la coltura degli amniociti),
- alterazioni genetiche (dopo la coltura degli amniociti ed estrazione del DNA),
- difetti strutturali (es., spina bifida, anencefalia);
- anomalie metaboliche ereditarie;
- stato di maturità polmonare (tramite il rapporto lectina/sfingomielina);
- paternità e sesso del nascituro.

# DNA fetale circolante

L'analisi del DNA fetale nel sangue materno sfrutta un fenomeno fisiologico naturale che si verifica durante la gravidanza per cui i frammenti di DNA del feto, derivanti dallo sfaldamento di cellule placentari, entrano normalmente nel circolo sanguigno materno.

Il cfDNA può essere isolato precocemente a partire dalla X settimana, quando raggiunge quantità sufficienti per il potenziale impiego clinico. La sua percentuale può variare tra <4% (non utile a livello diagnostico) fino al 10% del totale del DNA circolante (tra materno e fetale). Il cfDNA non è più reperibile nel circolo materno poche ore dopo il parto e probabilmente viene eliminato attraverso l'escrezione renale.



Le tecniche in uso analizzano il cfDNA totale, senza differenziare quello fetale da quello materno. Trattandosi, di fatto, di indagini basate su una commistione di DNA materno e placentare, questo non è un test diagnostico, ma di screening. Infatti, come nei test tradizionali, l'impiego di algoritmi dedicati permette di definire la probabilità post-test che il feto sia affetto da una delle principali trisomie autosomiche (trisomia 21 [T21], trisomia 18 [T18], trisomia 13 [T13]) o da un'aneuploidia dei cromosomi sessuali (X, XXX, XXY, XYY), analizzando selettivamente il numero dei frammenti di cfDNA contribuiti da ciascuno dei cromosomi oggetto del test.

I risultati sono riportati come "**basso rischio**" (negativi) o "**alto rischio**" (positivi).

Se il test cff-DNA risulta **negativo o a basso rischio, allora è altamente improbabile** che sia presente una trisomia 13, 18 o 21. Se il laboratorio effettua anche la ricerca di altre anomalie cromosomiche (cromosomi sessuali soprannumerari o microdelezioni), allora è improbabile che tali anomalie siano presenti.

È importante ricordare che il test cff-DNA è un test di screening e non diagnostico; pertanto, è possibile che sia presente un'anomalia cromosomica anche se il test risulta a basso rischio (**risultato falsamente negativo**). Inoltre, questo test non è in grado di identificare ed escludere tutte le anomalie cromosomiche o difetti genetici.

Nel caso in cui il test cff-DNA sia **positivo o a rischio alto/aumentato, allora il feto ha un maggiore rischio di presentare quelle anomalie cromosomiche**. È importante notare che mentre questo test è in grado di identificare correttamente l'aumentato rischio di sviluppare la Sindrome di Down, non risulta altrettanto accurato con le anomalie a carico di altri cromosomi, inclusi il 18, il 13 e l'X. Il test cff-DNA è un test di screening e non diagnostico; pertanto, è possibile che sia assente un'anomalia cromosomica anche se il test risulta positivo (**risultato falsamente positivo**).

Per la conferma o l'esclusione di anomalie cromosomiche è necessario sottoporsi a procedure maggiormente invasive, come l'analisi dei villi coriali, tramite il prelievo di un campione di tessuto della placenta, eseguibile tra la 10-ma e la 13-esima settimana di gestazione, o l'amniocentesi, eseguibile tra la 14-esima e la 18-esima settimana. L'analisi del cariotipo (o microarray) viene eseguito per confermare o escludere una sospetta alterazione cromosomica.

Talvolta, il risultato riportato sul referto può essere "**indeterminato**", se la quantità di cff-DNA presente nel campione di sangue della gestante è insufficiente per la rilevazione.

Questo test non è in grado di rilevare difetti del tubo neurale o della parete addominale.

# Screening del Secondo Trimestre di Gravidanza

Viene misurata la concentrazione di alcune sostanze nel sangue materno, al fine di valutare il rischio che il feto sia affetto da alcune patologie. Questo test viene eseguito nelle donne nel secondo trimestre di gravidanza. La valutazione complessiva dei risultati ottenuti dalla misura di queste sostanze, può essere utilizzata per determinare il rischio che il feto abbia un'anomalia cromosomica o difetti del tubo neurale.

L'esame è chiamato Triplo test; quando viene aggiunta la quarta, l'Inibina A, viene chiamato Quadruplo test o Quadritest.

- Alfa-fetoproteina (AFP) -- è una proteina prodotta dai tessuti fetali. Durante lo sviluppo, la concentrazione di AFP nel sangue fetale e nel liquido amniotico aumenta fino alla 12<sup>°</sup> settimana per poi decrescere gradualmente fino alla nascita. Una quota di AFP passa la placenta ed è quindi presente nel sangue materno. Alcune patologie del bambino possono far aumentare la concentrazione di AFP nel liquido amniotico e quindi nel sangue materno. Per questo il test dell'AFP può essere utilizzato come screening dei difetti del tubo neurale, come la spina bifida. Secondo le statistiche riportate dalla American College of Obstetrician and Gynecologist (ACOG), il test dell'AFP rileva i difetti del tubo neurale in circa l'80% dei casi.
- **Gonadotropina corionica umana** (hCG) -- è un **ormone** prodotto dalla placenta. La concentrazione di tale ormone nel sangue materno aumenta nel primo trimestre di gravidanza per poi decrescere nel periodo successivo. Nelle gravidanze in cui il feto è portatore dell'anomalia cromosomica della Sindrome di Down, l'hCG ha la tendenza ad essere più alta rispetto alla norma, mentre nelle gravidanze in cui il feto è portatore dell'anomalia cromosomica della Sindrome di Edwards, l'hCG ha la tendenza ad essere più bassa rispetto alla norma.
- Estriolo non coniugato (uE3) -- è un **estrogeno** prodotto dal feto. La concentrazione di tale ormone aumenta a partire dall'8<sup>°</sup> settimana fino a poco prima del parto. Nelle gravidanze in cui il feto è affetto da Sindrome di Down o Sindrome di Edwards, l'uE3 tende a rimanere più basso rispetto alla norma.
- Inibina A -- è un ormone prodotto dalla placenta. La concentrazione di Inibina A decresce leggermente dalla 14<sup>°</sup> alla 17<sup>°</sup> settimana di gestazione per poi aumentare di nuovo. La concentrazione dell'ormone ha la tendenza a rimanere alta nelle gravidanze in cui il feto è affetto da Sindrome di Down. L'uso del quarto marcatore, l'Inibina A, aumenta sia la **sensibilità** che la **specificità** dello screening per la Sindrome di Down. In accordo con le statistiche fornite da ACOG, il triplo test rileva la Sindrome di Down circa nel 69% dei casi, mentre il quadruplo test nell'81% dei casi.

Test di screening senza valenza diagnostica, ma indicatori di rischio (rischio normale o aumentato).

# Liquido seminale

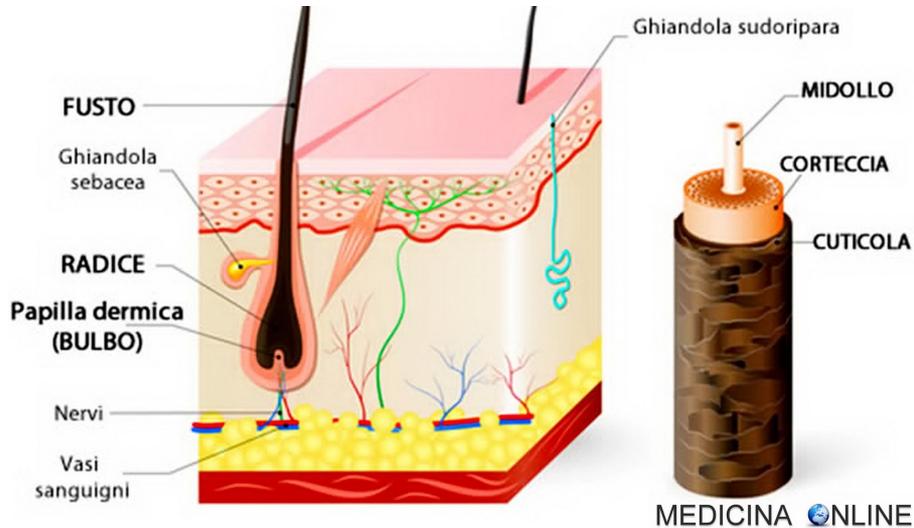
Il liquido seminale è costituito da spermatozoi immersi in un mezzo liquido chiamato **plasma seminale**. Quest'ultimo è essenziale per la maturazione, il metabolismo e la vita degli spermatozoi, nonché per la sopravvivenza degli stessi dopo l'eiaculazione.

## MODALITA' DI RACCOLTA

- Per la raccolta, il paziente deve osservare un periodo di astinenza (2-7 gg/3-5gg);
- La raccolta del campione deve essere completa in quanto il liquido seminale si forma solo al termine dell'ultima spinta quando si uniscono il secreto prostatico, epididimario e testicolare (sequenza temporale);
- Raccolto nel contenitore da urine;  
Quantità emessa normalmente: 2-6 ml.
- Se raccolto in sede diversa dal laboratorio il campione deve essere consegnato entro 30-60 minuti dalla raccolta. Il campione raccolto deve essere conservato a 37 gradi per 30 minuti per favorire la colliquazione prima dell'esecuzione delle indagini richieste.

# Capello

Composizione: acqua, proteine (80% soprattutto cheratina), oligonucleotidi e pigmenti (melanine). Tra i minerali fondamentali per la salute del capello troviamo Ca, Sr, B, Al, Si (etc.), **Zn, Mg, Cu e Fe**.



<b>Zinco</b>	stimola l'attività delle cellule germinative (150-180 mg/g)
<b>Magnesio</b>	stimola la formazione di AMPc utile all'attività cellulare (35-40 mg/g)
<b>Rame</b>	Facilita il metabolismo della tirosina per la sintesi della melanina e facilita la sintesi della cisteina (16-50 mg/g)
<b>Ferro</b>	Permette il trasporto dell'ossigeno utile per la funzionalità cellulare nei globuli rossi (4-12 mg/g)

# Capello

Il test tossicologico del capello rileva l'abuso o l'uso improprio (assunzione di farmaci in dosaggi diversi da quelli prescritti o utilizzo eccessivo di sostanze legali) di droghe nella matrice pilifera.

L'esecuzione del test tossicologico sulla matrice cheratinica offre numerosi vantaggi rispetto alle altre matrici biologiche, inclusi la possibilità di incrementare la finestra di rilevamento delle sostanze e di delineare l'andamento del consumo di droga nel tempo.

Questo tipo di test può essere utilizzato per verificare l'uso cronico o improprio di droghe, determinarne il consumo a lungo termine e verificare un eventuale periodo di astinenza.

Il test tossicologico del capello può essere utilizzato in diverse circostanze:

- **Ambito lavorativo**; il test per le droghe viene effettuato nell'ambito degli accertamenti previsti dalla medicina del lavoro, in special modo per alcune categorie di lavoratori con mansioni particolari (come sancito dal D.lgs 81/08 per la sicurezza sul lavoro). Solitamente, i test tossicologici in ambito lavorativo vengono eseguiti su matrice urinaria, ma talvolta può essere utilizzata anche quella cheratinica,

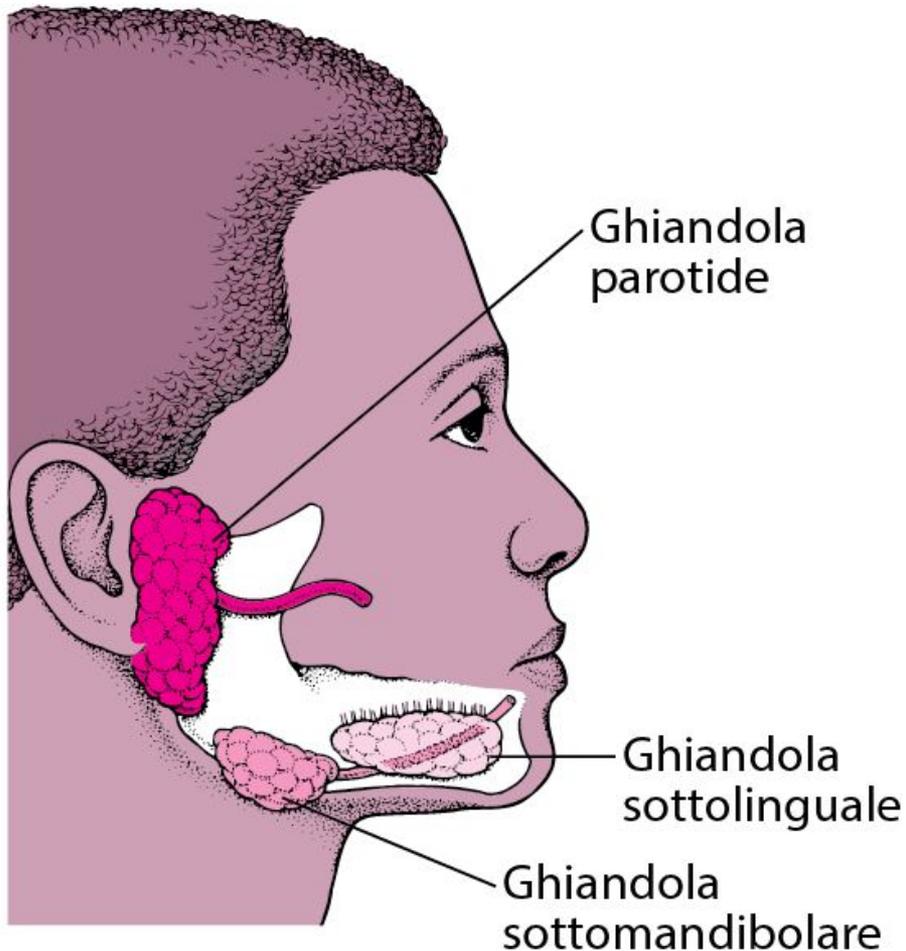
- **Analisi forensi e medico-legali**; per stabilire se la causa di un decesso possa essere correlata con l'uso e l'abuso di alcune sostanze o nei giudizi di idoneità alla guida da parte di Commissioni Patenti o ancora in casi di affidamento di minore,

- **Screening clinico**; il campione di capelli viene utilizzato raramente per ottenere informazioni circa la salute del paziente; tuttavia, può rivelarsi utile in molte altre circostanze, come ad esempio nella diagnosi di sindrome feto alcolica,

- **Programmi di riabilitazione**; per determinare l'aderenza ai protocolli terapeutici prescritti dai Sert e dalle Comunità di recupero per tossicodipendenti.

Il capello viene prelevato solitamente nell'area posteriore della testa (vertex), il più possibile vicino al cuoio capelluto da personale esperto (per garantire veridicità e idoneità del campione).

# Saliva



La saliva è un liquido acquoso e lievemente filante prodotto dalle ghiandole salivari maggiori e minori.

La saliva è composta principalmente da acqua (99,4%), sali, sostanze organiche (0,6%: glucosio, acidi grassi, colesterolo, urea, acido urico, aminoacidi e proteine). I sali presenti sono quelli di sodio, potassio, cloro, calcio, magnesio.

Gli adulti producono 1000-1500 mL di saliva al giorno. La quasi totalità rientra nel canale alimentare e viene riassorbita.

L'esame della saliva viene richiesto per:

- disordini endocrini;
- patologie autoimmuni;
- test genetici;
- allergie;
- parassitosi;
- disordini metabolici;
- infezioni;
- cancro

Effettuare la raccolta al mattino prima del lavaggio dei denti, oppure durante il giorno a distanza dai pasti e bevande per evitare l'alterazione del pH.

**Tabella 1** Valori di riferimento per l'analisi della saliva.

Caratteristica analizzata	Valori di riferimento
pH	6,8-7,5
Na <sup>+</sup>	2-21 mmol/L
K <sup>+</sup>	10-36 mmol/L
Cl <sup>-</sup>	5-40 mmol/L
Mg <sup>2+</sup>	0,08-0,5 mmol/L
Ca <sup>2+</sup>	1,2-2,8 mmol/L
HCO <sup>3-</sup>	25 mmol/L
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,4-39 mmol/L
Glucosio	1 mg/dL
Cortisolo	Sesso femminile: h 06-10: < 7,83 µg/L h 16-20: < 2,43 µg/L h 24 (±0,5): < 2,08 µg/L Sesso maschile: h 06-10: < 7,83 µg/L h 16-20: < 2,43 µg/L h 24 (±0,5): < 2,08 µg/L

Glucosio	Parassitosi
Cortisolo (Cushing/Addison)	Allergie
Melatonina (ghiandola pineale/neonati)	Malattie infettive (HIV, Helicobacter)
LH, Pg, E2, DHEAS	innalzamento precoce PCR in caso di malattia cardiaca
Testosterone	EtOH e metaboliti
DNA	droghe (cocaina, morfina, cannabis)

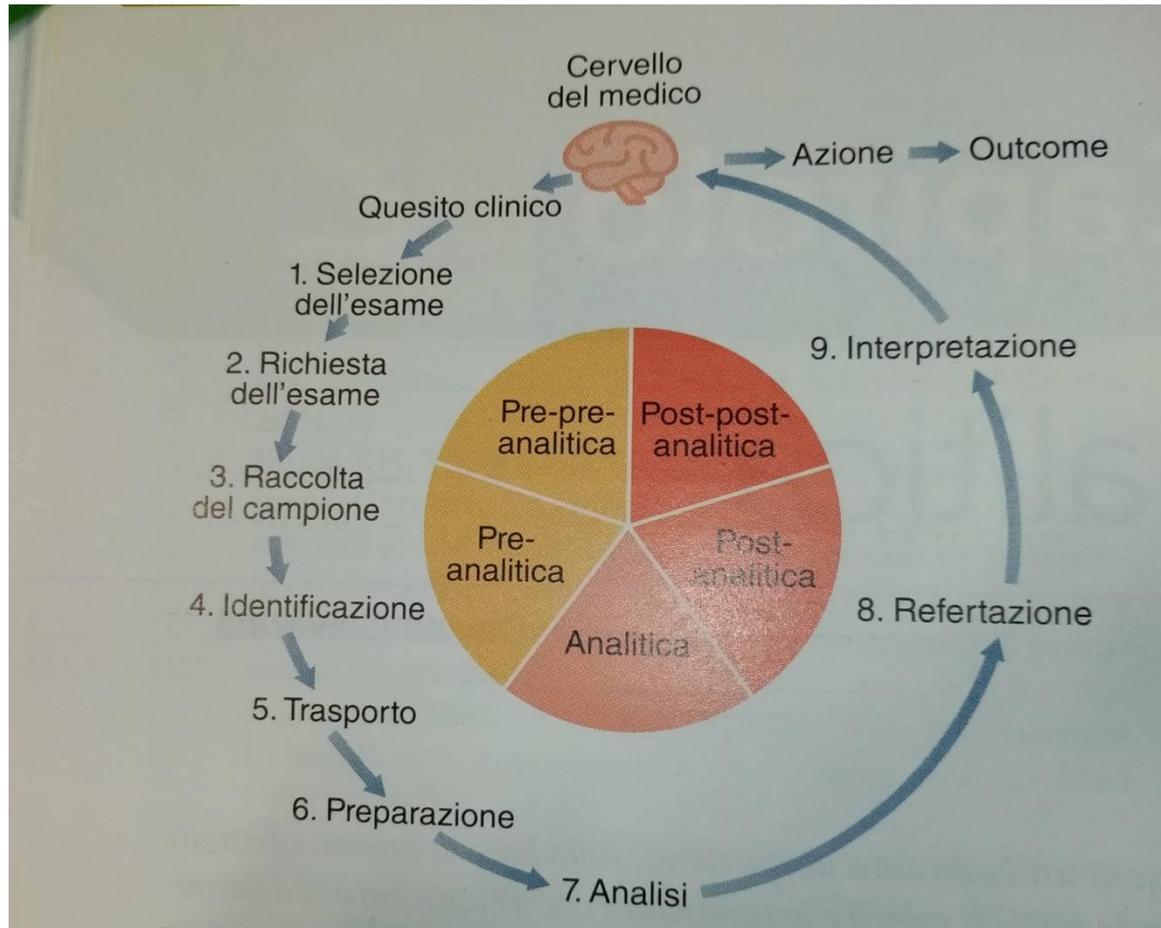


Brain to brain loop

# Brain to Brain loop (George Lundberg)

Pre analitica:  
60% errori

Post  
analitica:  
20% errori



# Errori pre analitici in relazione al campione

Tempo	Errore
Prima della raccolta del campione	Richiesta inappropriata, esame non necessario, errore di identificazione del pz, errore di identificazione del campione
Durante la raccolta del campione	Volume insufficiente, errato anticoagulante, campione con coaguli, campione emolizzato, contaminazione del campione, sito inappropriato di raccolta
Dopo il prelievo	Errore di etichettatura, inappropriato trasporto, problemi (tempo e temperatura) di conservazione, errore di centrifugazione

# Trasporto e spedizione (intra ed extramurale)

Il trasporto dall'interno o dall'esterno della struttura addetta alla lavorazione del materiale biologico segue indicazioni diverse:

- Il trasporto *intramurale* prevede il trasferimento del materiale dal sito di prelievo a quello di analisi e viene effettuato da infermieri o da personale specializzato che utilizzano provette o appositi contenitori sistemati in alloggiamenti idonei e accompagnati da fogli ed etichette di identificazione.
- Il corretto trasporto del materiale biologico è fondamentale per la riuscita delle determinazioni analitiche al fine di ridurre al minimo i rischi di errori nella valutazione

## Fattori da tenere sotto controllo nel corso del trasporto

1. Esposizione a energia meccanica: vibrazione e scuotimenti possono causare emolisi

2. Esposizione alla luce: alcune sostanze come la bilirubina sono fotosensibili e si degradano se esposte alla luce solare

3. Esposizione al calore: alcuni analiti sono molto instabili per cui necessitano di essere raffreddati immediatamente una volta eseguito il prelievo. Esempi: ammoniaca, lattato, omocisteina.

4. Esposizione all'aria da evitare quando si devono dosare analiti volatili come etanolo, ammoniaca, acidi organici

5. Contaminazioni chimiche e microbiologiche soprattutto nei campioni di urine

# Accettazione dei materiali e conservazione

- L'addetto all'accettazione deve verificare che si siano mantenute e rispettate tutte le misure previste nelle manipolazione preanalitiche;
- in caso di non idoneità il campione deve essere respinto e richiesto l'invio di nuovo materiale biologico
- Non sempre i campioni giunti in laboratorio sono immediatamente trattati. Per periodi brevi si possono conservare a +4°C, altrimenti è consigliabile il congelamento a -20°C

## Esempi di analiti richiedenti modalità speciali di raccolta, trasporto e conservazione

Analita	Anticoagulante	Tattamento per conservazione
Insulina		Congelare
Vitamina A		Proteggere dalla luce
Aminoacidi	Eparina 0,2 mg/ml	Congelare
ACTH	Eparina 0,2 mg/ml	Congelare entro 15 minuti dal prelievo
Calcitonina		Congelare
Fibrinogeno	Citrato 4 mg/ml	Non usare eparina
Emoglobine patologiche	EDTA 2 mg/ml	EDTA 2 mg/ml

# Errori pre analitici in relazione al paziente



## Dieta e digiuno prolungato

La dieta, il digiuno prolungato oppure un pasto recente, possono comportare forti variazioni nella concentrazione di alcuni analiti.



La caffeina inibisce la fosfodiesterasi e, quindi, la degradazione dell'AMP ciclico. AMPc a sua volta, promuove la glicogenolisi con aumento della glicemia.

La caffeina agisce anche sulle lipasi aumentando la concentrazione di acidi grassi non esterificati che, a loro volta, potrebbero spiazzare ormoni legati a proteine di trasporto (i.e. albumina) [ex. aumento dell'attività della renina plasmatica a 3 ore da assunzione di caffeina].

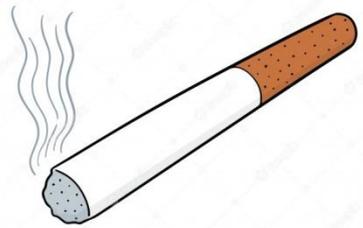
# Esempi analiti influenzati dalla dieta

## Glicemia

Azotemia (risente dell'apporto proteico e della diversa idratazione)

Trigliceridi e colesterolo sono altri due parametri molto sensibili: il primo risente della metabolizzazione degli zuccheri ingeriti sotto forma di dolci o carboidrati, il secondo di cibi grassi.

Gamma GT: I valori di Gamma GT elevati indicano abuso di alcol o eccesso di grassi, parte dei quali si accumula nel fegato.



Il fumo induce cambiamenti cronici ed acuti in alcuni analiti. I cronici sono più modesti e riguardano, ad esempio, il CEA (antigene carcinoembrionario) che è più alto nei soggetti neoplastici fumatori. Cambiamenti in acuto sono più rilevanti. Ad 1-3 ore dal fumo si osserva un aumento di leucociti, piombemia, fibrinogeno e una diminuzione di ACE (angiotensin converting enzyme).



Il consumo di alcol etilico in quantità elevate comporta diminuzione della glicemia ed aumento dell'acido lattico per blocco della gluconeogenesi; un aumento dell'acido urico; aumento di gamma GT; uno stato di acidosi metabolica; aumenta l'aldosterone, mentre diminuiscono prolattina, cortisolo e osteocalcina.

# Errori pre analitici in relazione al paziente

## Postura, riposo ed esercizio fisico



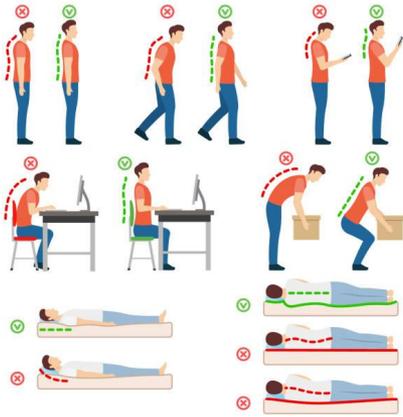
Cambiamenti acuti durante l'esercizio fisico possono essere dovuti allo spostamento del volume tra il comparto intravasale ed interstiziale, alla sudorazione ed al cambiamento nella concentrazione di alcuni ormoni (aumento catecolamine, cortisolo, ACTH, glucagone e diminuzione insulina).

Un allenamento intenso puo' determinare uno stato ipossico con aumento della creatinichinasi. Marker cardiaci possono aumentare nell'esercizio intenso.

Transaminasi e CPK sono enzimi rilasciati dalle fibre muscolari in seguito ad attività fisica.

### Effetto dell'esercizio protratto (determinati 15 min dopo e 20 min di esercizio)

Analita	Aumento %	Analita	Diminuizione %
Fosfatasi acida	11	Albumina	4
Creatinina	17	Bilirubina	4
Fosforo	12	Ferro	1
Urato	4	LDH	1
Calcio	1	Potassio	8
Colesterolo	3	Sodio	1
Proteine totali	3	Lipidi totali	12
Fosfatasi alcalina	3		
Alanina aminotrasferasi	41		
Aspartato aminotrasferasi	31		
Azoto Ureico	3		

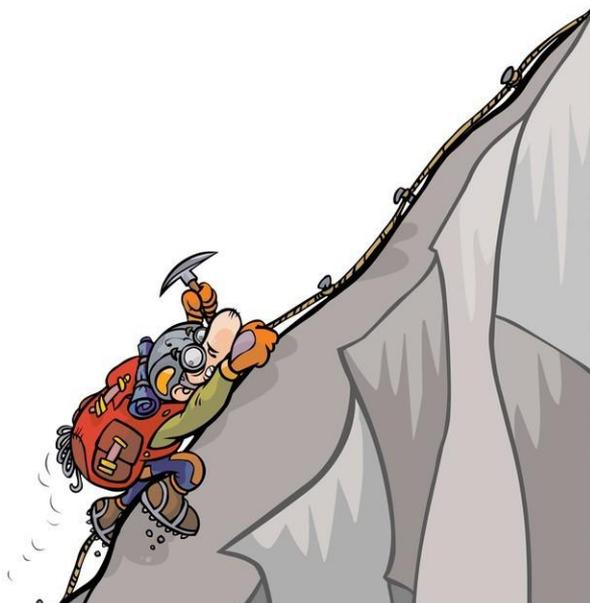


La postura del soggetto al momento del prelievo e nei minuti precedenti puo' modificare alcuni analiti. La pressione effettiva di filtrazione capillare aumenta nelle basse estremita' passando da supini a posizione eretta.

Come conseguenza l'acqua si muove dal compartimento intravasale all'interstizio con riduzione del volume plasmatico di circa 12%. Le particelle con diametro superiore a 4 nm vengono trattenute.

Da eretti a supini avviene esattamente l'inverso con apparente concentrazione delle cellule, delle macromolecole e delle molecole legate a proteine.

Il passaggio dalla posizione supina a quella eretta puo' modifica alcuni analiti come calcio, fosforo, bilirubina, magnesio, ferro, colesterolo



L'altitudine aumenta i livelli di proteina C reattiva (oltre il 65% in piu' a 3600 s.l.m.), di beta-2-globulina (43% in piu' a 5400 m). Aumenta l'ematocrito, l'emoglobina e l'acido urico.

Aumentano creatinina urinaria, transferrina, renina plasmatica, l'estriolo.

# Errori pre analitici in relazione al paziente

Assunzione di farmaci



Stress psicologico



# Errore pre-analitico nella raccolta di sangue venoso

- ❑ **Prelievo:** Una delle principali cause di errore nella fase preanalitica è la raccolta di campioni non idonei per quantità e qualità.

Ciò è riferibile all'eventualità in cui il campione abbia un volume scarso per completare l'esecuzione di tutte le analisi richieste, non sia rispettato il rapporto tra sangue ed anticoagulante (soprattutto per campioni destinati ad analisi di coagulazione o emocitometria), sia stato raccolto nella provetta sbagliata.

Per ovviare a questo problema, è preferibile utilizzare provette con etichette che, oltre all'identificazione positiva del paziente, indichino specificatamente l'area diagnostica

## Prima del prelievo

Prescrizione di test errata

Errore di identificazione

Errore nella preparazione del paziente

Paziente non digiuno, mancato rispetto del ciclo circadiano, paziente non a riposo

## Durante il prelievo

Contenitore o additivo sbagliato

Errato rapporto tra additivo e campione

Emolisi da ago troppo sottile o da eccessiva depressione

Mantenimento del laccio prolungato (>1 minuto)

## Dopo il prelievo

Inadeguato mescolamento

Errore etichettatura

Errore nel trasporto

Contenitore inadeguato, tempo eccessivo, sbalzi termici, esposizione aria/luce

Errato trattamento in laboratorio (centrifugazione, aliquotazione, immagazzinamento)

La Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC), la Società Italiana di Medicina di Laboratorio (SIMeL), di concerto con il Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi Ematologici e di Laboratorio (CISMEL), per mezzo del Gruppo di Studio (GdS) intersocietario sulla “Standardizzazione della variabilità extra-analitica del dato di laboratorio”, hanno proposto delle indicazioni sotto forma di raccomandazioni (GRADING) definite con il metodo delle conferenze di consenso, sul corretto svolgimento della procedura di raccolta dei campioni di sangue venoso.

## Definizione della forza delle raccomandazioni, in accordo con le indicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità.

- A** L'esecuzione di quella particolare procedura è fortemente raccomandata. Indica una particolare raccomandazione sostenuta da prove scientifiche di buona qualità.
- B** Si nutrono dei dubbi sul fatto che quella particolare procedura o intervento debba sempre essere raccomandata, ma si ritiene che la sua esecuzione debba essere attentamente considerata.
- C** Esiste una sostanziale incertezza a favore o contro la raccomandazione di eseguire la procedura o l'intervento.
- D** L'esecuzione della procedura non è raccomandata.
- E** Si sconsiglia vivamente l'esecuzione della procedura.



# Dispositivi per il prelievo ematico

Le considerazioni sui dispositivi utilizzati per il prelievo di sangue venoso vertono su:

- (I) norme relative alla sicurezza (di paziente ed operatore),
- (II) valutazioni di natura tecnica ed economica. Fatte salve alcune eccezioni, è oggi raccomandabile utilizzare dispositivi che prevedano l'integrazione di aghi monouso, sistemi di supporto (*holder*, adattatori o "camicie") e provette primarie sottovuoto ("vacuum")

(Raccomandazione di Grado A).

- nella ragionevole certezza che l'*holder* non sia stato contaminato da sangue, esso può essere riutilizzato (Raccomandazione di Grado B).
- Qualora, al contrario, vi sia anche solo il sospetto di contaminazione ematica, l'*holder* non deve essere sterilizzato (Raccomandazione di Grado D) ma eliminato (Raccomandazione di Grado A).

Le siringhe rappresentano una possibile alternativa qualora:

- (I) in situazioni d'emergenza non sia possibile reperire dispositivi di cui sopra  
(Raccomandazione di Grado B),
- (II) particolari situazioni anatomiche e/o fisiche rendano impossibile o sconsigliabile utilizzare i dispositivi di cui sopra (vene facilmente collassabili quando sottoposte alla pressione negativa del vuoto presente nel tubo primario)  
(Raccomandazione di Grado B)

Qualora si opti per l'utilizzo della siringa, al fine di evitare contaminazione o punture accidentali, si consiglia di togliere l'ago dalla siringa utilizzando gli appositi dispositivi (mai con le mani), far defluire lentamente il sangue nelle provette preventivamente stappate avendo cura di evitare la formazione di schiuma, riempire a volume richiesto le provette, ritappare le provette una per una, mescolare dolcemente per inversione (4-6 volte secondo le modalità già indicate) le provette contenenti anticoagulanti  
(Raccomandazione di Grado A).

# Calibro dell'ago

- ❑ I dati della letteratura sono concordi nell'indicare che aghi di piccolo calibro, di diametro inferiore a 23 Gauge (G), possono produrre emolisi e modeste variazioni di alcuni comuni analiti (soprattutto ioni, indici fibrinolitici e conta piastrinica). In linea generale, si consiglia quindi di preferire aghi di calibro pari a 20 o 21G (Raccomandazione di Grado A),
- ❑ riservando l'utilizzo di aghi di calibro inferiore a prelievi su vene piccole o particolarmente fragili (Raccomandazione di Grado B).
- ❑ L'uso di agocannule, preferito dai servizi di Pronto Soccorso e di emergenza in genere, può essere causa di emolisi nel campione.

La buona riuscita di un prelievo ematico non dipende soltanto dalla competenza dell'operatore, ma anche da una serie di variabili indipendenti, quali il luogo, il dispositivo, l'anatomia del paziente, la sua emotività.

Le considerazioni e raccomandazioni riportate in seguito rappresentano sostanzialmente una sintesi della *"best practice"* per l'esecuzione di un prelievo ematico.

## Norme relative al paziente

- La prima operazione che il prelevatore deve compiere è accertare l'identità del paziente. Secondo le indicazioni della *Joint Commission* (JC), tale attività richiede l'utilizzo di almeno due criteri identificativi, nessuno dei quali deve essere il numero di stanza (Raccomandazione di Grado A). Preferibilmente questi criteri comprendono (in ordine decrescente di efficacia):
- Controllo del braccialetto (recante codice a barre, *chip* a radiofrequenza o dati anagrafici del paziente), controllo della tessera sanitaria o altro documento.
- Soprattutto nelle stanze di degenza ove siano ricoverati più pazienti, il prelevatore entra in stanza con il solo set di provette destinate ad un paziente (Raccomandazione di Grado A) e preleva sempre e solo un paziente alla volta (Raccomandazione di Grado A).



Per provetta destinata ad esami di coagulazione, non è necessario raccogliere ed eliminare una provetta precedente Grado B

Verificare che la quantità di sangue aspirato dal tubo primario sia idonea Grado A

Invertire gentilmente 4-6 volte le provette contenenti anticoagulante Grado A

Non aprire mai le provette sottovuoto, ne trasferire sangue da una provetta all'altra (fatto salvo l'uso di siringhe per il prelievo) Grado A

In presenza di errori, verificare la necessità di raccogliere altri campioni o contattare il laboratorio per delucidazioni Grado A

Rilasciare il laccio prima di estrarre l'ago dalla vena, posizionare immediatamente un batuffolo di ovatta sul sito di prelievo, chiedendo al paziente di operare una pressione moderata sullo stesso, mantenendo il braccio disteso Grado A

### ***Norme da seguire al termine del prelievo***

Eliminare il materiale contaminato in appositi contenitori di sicurezza idonei per il riconoscimento del tipo di materiale Grado A

Non reincappucciare, spezzare o frantumare direttamente l'ago utilizzato) Grado A

Verificare lo stato di salute del paziente e l'insorgenza di eventuali complicazioni Grado A

### ***Altre norme generali***

Osservare sempre un atteggiamento di disponibilità e cortesia	Grado A
Evitare di accanirsi con l'ago all'interno del sito di prelievo	Grado A
In caso di fallimento al primo tentativo:	
- avanzare o arretrare cautamente l'ago	Grado A
- sostituire la provetta	Grado A
- estrarre l'ago e ritentare se l'esito è ancora negativo	Grado B
- trasferire il paziente ad un collega dopo due tentativi falliti	

# Variabilità della misura in fase analitica

Analizzare un campione in laboratorio significa fornire la stima di una grandezza il cui valore vero è sconosciuto.

Lo scostamento tra misura e valore reale è conosciuto come errore totale della misura.

La variabilità analitica è il risultato dell'errore totale commesso nel determinare la concentrazione dell'analita.

Non esistono laboratori in cui non si commettono errori: esistono laboratori in cui non si conosce quanti errori si commettono (generalmente si è convinti di non commetterne) e laboratori in cui si sa quanti se ne commettono.

# Errori di misura

**casuali**

**sistematici**

**grossolani**

# ERRORI CASUALI O ACCIDENTALI

Definizione: **Differenza tra valore analitico e valore reale che si presenta in maniera irregolare, apparentemente non correlata a specifiche azioni, con aumenti o diminuzioni non consecutivi e con dimensioni quantitative incostanti**

- Sono sempre inevitabili, di piccola entità, e non possono essere recepiti dall'operatore
- Anche operando in condizioni analitiche standardizzate, si ottengono risultati leggermente differenti fra loro pur essendo distribuiti con regolarità attorno al valore medio (valore centrale) della curva gaussiana
- Per tale motivo il risultato si dice *impreciso*
- Possono essere errori casuali: piccole variazioni nella tensione di alimentazione, modeste variazioni nella erogazione del gas e quindi della fiamma negli spettrofotometri a fiamma, cattivo mescolamento dei reagenti, coagulo, fibrina

# ERRORI SISTEMICI

Definizione: **Differenza tra valore analitico e valore reale che si presenta in maniera regolare, con aumenti o diminuzioni consecutive di entità costante. I risultati sono sistematicamente inferiori o superiori al valore vero.**

- Le cause sono conosciute e individuabili e definiscono l'accuratezza dell'analisi
- Spesso si eliminano usando una metodica più sensibile o specifica

# ERRORI GROSSOLANI

- Sono dovuti generalmente a negligenza dell'operatore
- Si evitano con la maggiore attenzione di quest'ultimo
- Esempi: l'uso di una pipetta da 2 ml anziché di una da 1 ml; lo scambio di reagenti, la selezione errata di una lunghezza d'onda, l'errore di un calcolo
- Essi sono veri e propri sbagli che si possono eliminare con l'impegno del personale che opera e con una buona organizzazione di laboratorio

## Riduzione dei fattori di variabilità analitica

Controllo di processo	Ottimizzazione di procedure, metodi ed apparecchiature. I protocolli operativi devono essere scritti in maniera chiara, accessibili a tutti e deve essere certa la loro comprensione e conoscenza da parte di tutto il personale di laboratorio. Le apparecchiature devono essere sottoposte a manutenzione e aggiornamento.
Controllo di prodotto	Comprende i controlli di qualità, l'analisi dei dati, l'archiviazione dei dati.

## Il Controllo di Qualità Interno (CQI) La Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)

- Nel nostro Paese sono resi obbligatori da una serie di normative internazionali, nazionali e regionali
  - Decreto Lgs 30.12.1992 n°502 (G.U.n.305 del 30.12.1992)
  - Decreto Lgs 14.01.1997 n°37 (G.U. n.42 del 20.02.1997)
  - Linee Guida CQI Regione Lombardia (BUR 26.01.2006)
  - Linee Guida SIBioC
  - Linee Guida SIMeL
  - CLSI Document C24-A3 2006

Il controllo interno di qualità dalla teoria alla pratica: guida passo per passo

## Normative e linee guida

- Dal DPR n.37 sui Requisiti Minimi del 14 gennaio 1997 (pubblicato 20/02/1997):
  - **QC interno**: dati da conservare per 1 anno
  - **VEQ**: dati da conservare per 3 anni
    - promosso dalle Regioni
- **Accreditamento istituzionale**:
  - autorizzazione dello stato/regione affinché il lab. sia inserito nell'elenco dei fornitori di prestazioni diagnostiche e ottenga i rimborsi previsti dalla legge
- **Linee guida SIBioC e SIMeL sul Controllo di Qualità Interno**

# Perché un sistema di CQ è necessario?

- **Normative**

**ISO (International Organization for Standardization)**

Raccomanda l'uso di sistemi di CQI per assicurare l'affidabilità dei risultati di laboratorio dei pazienti

**CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**

*"I materiali di controllo devono essere differenti dai materiali usati per la calibrazione"*

USA

**CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments)**

*"I laboratori devono eseguire i controlli a intervalli prestabiliti... bisogna usare almeno due livelli di concentrazione"*

- **Impatto sui pazienti: Teoria degli errori e opinioni scientifiche**
  - **Considerazioni di risparmio economico**
  - **Costruire e mantenere la credibilità dell'Ente fornitore**
-

## Considerazioni economiche



Le conseguenze dell'assenza di Controllo di Qualità o di un CQ insufficiente potrebbero essere:

- Sedute analitiche ripetute (costo dei reagenti) senza una vera conoscenza della qualità analitica prodotta
- **Falsi positivi:**
  - Diagnosi o decisioni errate
  - Provvedimenti diagnostici o legali non necessari
- **Falsi negativi:**
  - Diagnosi o decisioni errate o ritardate
  - Provvedimenti diagnostici o legali presi troppo tardi o non presi affatto
  - Rischi per i pazienti e per la cittadinanza
- **Costi per cause da parte di pazienti, società assicurative, ecc.**

## Frequenza di esecuzione del QCI

- Minima: 1 controllo al giorno per ciascun analita
- Almeno 1 per ogni seduta analitica se il test non viene eseguito tutti i giorni
- Almeno 2 al giorno se si eseguono serie multiple nelle 24 h
- **NB:** i controlli vanno considerati come campioni normali e processati in modo random durante la seduta

# LIMITI ACCETTABILI DI ERRORE

- Per controllare l'accuratezza di una analisi si introducono nella serie da analizzare in maniera casuale uno o più campioni a concentrazione nota. Questi devono coprire l'intero range sia dei valori normali che patologici
- Il risultato della misura non deve divergere dal valore teorico oltre un certo limite predeterminato

- Tale limite risulta collegato alla deviazione standard tra la serie del metodo analitico considerato.
- Definendo la deviazione percentuale del valore teorico con:
  - $\mu - x \cdot 100 / \mu$
  - dove:  $\mu$  = valore teorico  
 $x$  = valore trovato

- Si assume di ritenere accettabile l'accuratezza quando:
  - $\mu - x \cdot 100$  diviso  $\mu$
  - è minore di 3.CV

# ATTENDIBILITÀ' DI UNA MISURA

L'*attendibilità* di un risultato analitico è determinata da un insieme di fattori che caratterizzano globalmente un risultato o un metodo analitico.

## LIMITI FIDUCIARI

- E' il limite di misura entro il quale si può avere fiducia che sia compresa la misura vera della grandezza
- Si intendono *limiti fiduciari* o di *confidenza* di un risultato i valori corrispondenti a  $\pm 2$  DS di un risultato isolato ottenuto con un metodo di cui si sia previamente calcolata la deviazione standard su almeno 25 dati sperimentali

**ACCURATEZZA:** Definisce la "vicinanza" del valore fornito dall'analisi al VALORE REALE del parametro analizzato. **Accuratezza** è sinonimo di **Correttezza**

**PRECISIONE:** Indica quanto vicini sono tra loro i valori ottenuti in successive determinazioni dello stesso campione **Precisione** è sinonimo di **Riproducibilità**

---

**SPECIFICITA':** capacità di un test di individuare solo l'analita che si ricerca e quindi di eliminare i falsi positivi

**SENSIBILITA':** capacità di un test di individuare la più piccola quantità di analita determinabile e quindi eliminare i falsi negativi

---

**VALORE PREDITTIVO:** capacità di un test di predire un evento statistico

IL VALORE PREDITTIVO di un test positivo indica la probabilità che il soggetto abbia la malattia, il VALORE PREDITTIVO di un test negativo riflette la possibilità che l'individuo non sia affetto dalla malattia

**In generale:** quanta più alta è la percentuale di individui affetti dalla malattia nel momento in cui il test viene eseguito, tanto maggiore è il valore predittivo di un risultato positivo del test

---

**VALORI DI RIFERIMENTO (VALORI NORMALI):** Il referto di un test di laboratorio è sempre accompagnato dall'indicazione **dell'intervallo entro il quale ci si aspetta sia compreso il valore del parametro analizzato.** Questo intervallo comprende i valori che si osservano negli individui sani

---

## ACCURATEZZA e PRECISIONE

### ESEMPIO

Concentrazione nota del glucosio in un campione = 100 mg/dl

Metodo A: Cinque determinazioni: 109, 110, 112, 108, 111

Media = 110

Metodo B:

Cinque determinazioni: 90, 110, 120, 80, 100

Media=100 mg/dl

Metodo A: più riproducibile, quindi più preciso

Metodo B: più accurato

### Commento:

I risultati forniti dal metodo B sono troppo variabili perché esso possa essere utilizzato nella pratica clinica.

I valori forniti dal metodo A sono più coerenti tra loro e, benché più elevati del valore reale, offrono al medico una maggiore affidabilità

# PRECISIONE

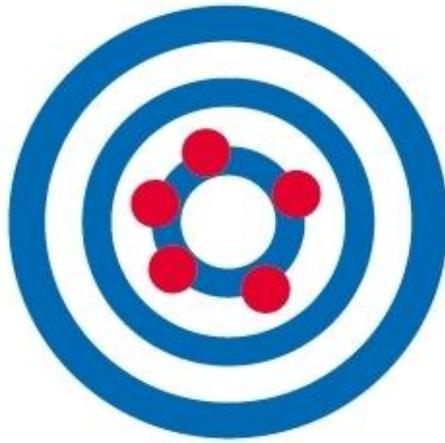
Il concetto di precisione include quelli di *ripetibilità*, intesa come la misura della deviazione dal valore medio dei risultati ottenuti da uno stesso operatore, in una unica serie analitica e senza cambiare reattivo o apparecchio; e *riproducibilità*, cioè la misura della deviazione dal valore medio dei risultati ottenuti in un arco variabile di tempo da operatori diversi che non conoscono l'identità del campione analizzato e che usano lotti di soluzioni e reagenti diversi.

# ACCURATEZZA

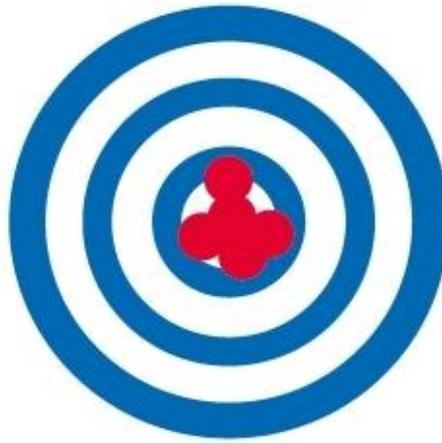
L'*accuratezza* del metodo è il grado di concordanza fra il valore medio trovato in repliche diverse di una stessa analisi sul medesimo campione ed il valore reale o più probabile conosciuto



Preciso



Accurato



Preciso e  
accurato



Né preciso,  
né accurato

**Figura 8** Accuratezza e precisione di un metodo analitico.

# SPECIFICITA'

La *specificità* invece è la proprietà del metodo di dosare solo ed interamente la sostanza di interesse senza interferenze di qualunque tipo da parte di altre sostanze presenti nel campione. Corrisponde alla capacità di una tecnica analitica di non risentire della presenza di interferenti o di componenti diversi dall'analita in esame.

# SENSIBILITA'

- *Sensibilità* è la capacità del metodo di dosare anche piccole concentrazioni della sostanza di interesse
- *Rivelabilità* è la più piccola quantità di sostanza che il metodo riesce a dosare con un certo limite fiduciario, circa 95 %; può anche venire definito, dal punto di vista strumentale, in termine di rapporto tra segnale analitico e segnale di fondo (noise)
- *LOD (Limit of detection)*: la minima quantità di sostanza evidenziabile con il metodo in esame come diversa da zero.

# Variabili naturali-biologiche

I parametri ematochimici variano fisiologicamente in ciascun individuo: essi sono più o meno stabili nei diversi momenti della vita e variano tra i diversi soggetti, nel senso che ciascuno mostra un suo caratteristico quadro ematochimico risultato dal complesso sistema di equilibrio metabolico individuale.

Età

Sesso

Etnia

Ritmi

- *La concentrazione dei componenti del sangue è il risultato di un equilibrio dinamico*
- *Tale equilibrio è controllato da forze che tendono a mantenerlo regolato ad un valore fisso, vantaggioso per l'organismo, detto **punto omeostatico***
- *La oscillazione intorno al punto omeostatico caratteristica di ciascun componente e di ciascun individuo rappresenta la **variabilità biologica intra-individuale***
- *La variazione del punto omeostatico di ciascun componente da individuo ad individuo è la **variabilità biologica inter-individuale***
- *La variabilità biologica intra-individuale e quella inter-individuale sono espresse come **coefficiente di variazione (%)***



**TABELLA 4.10**

Effetto dell'età in soggetti di sesso maschile

	Valore basale	Variazione percentuale			
	<29	30-39	40-49	50-59	60-69
Albumina (g/dL)	4,6	0,2 ↓	0,3 ↓	0,4 ↓	0,6 ↓
Fosfatasi alcalina ALP (U/L)	51	3 ↓	1 ↓	1 ↑	4 ↑
Aspartato aminotrasferasi AST (U/L)	41	3 ↑	3 ↑	1 ↑	1 ↑
Bilirubina (mg/dL)	0,4	0,1 ↑	0	0	0
Calcio (mg/dL)	9,8	0,1 ↓	0,2 ↓	0,2 ↓	0,3 ↓
Colesterolo (mg/dL)	211	29 ↑	43 ↑	48 ↑	36 ↑
Creatinina (mg/dL)	1,1	0	0,1 ↑	0,1 ↑	0
Glucosio (mg/dL)	108	1 ↑	6 ↑	2 ↑	9 ↑
Fosforo (mg/dL)	4,0	0,1 ↓	0,3 ↓	0,2 ↓	0,2 ↓
Proteine tot. (g/dL)	7,6	0,1 ↓	0,2 ↓	0,2 ↓	0,2 ↓
Azoto ureico (mg/dL)	15	1 ↑	1 ↑	2 ↑	3 ↑
Urato (mg/dL)	5,9	0	0,2 ↑	0,1 ↓	0,2 ↓

(Da Leonard P.J.: The effect of age and sex on biochemical parameters in blood of healthy human subjects. In: Reference Values in Human Chemistry. G. Siest, Ed. Basel, Karger, 1973, pp. 134-140)

## Nell' anziano

- **non varia:** escrezione delle proteine, Na, K, Cl, CO<sub>2</sub>, pH, Ca tot, proteine totali, enzimi epatici, bilirubina tot, Mg
- **aumenta:** Ca ionizzato, glucosio, insulina, LH, FSH, TSH  
Tg, gGT, urea, IgA, LDL, HDL, Cu, LDH5, gastrina
- **diminuisce:** fosfato e testosterone (solo uomini), estriolo, IgM, IgD, (solo donne), androsterone, progesterone, T3 e T4, Zn, Fe, Hb, G.R., leucociti, piastrine

# RITMI CIRCADIANI

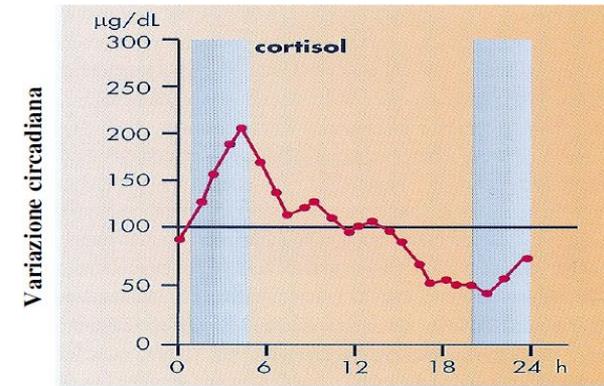
Il **RITMO CIRCADIANO** è la variazione di concentrazione sierica o urinaria di una sostanza nell' arco della giornata

Ritmo **ULTRADIANO** = inferiore alle 24 ore

Ritmo **INFRADIANO** = superiore alle 24 ore

## 1. Le più importanti variazioni circadiane

ANALITA	h PICCO	% VARIAZIONE
Na	13.00	2
K	11.00	19
Glucosio	18.00	59
Fosforo	22.00	38
Urea	23.00	25
Colesterolo	22.00	11
Bilirubina tot	7.00	62
Proteine tot	18.00	8
GGT	10.00	960
TSH	2.00	206
Cortisolo	7.30	1111
Melatonina	3.00	211
Ferro	12.08	32
Aldosterone	8.00	95





## Differenze legate al sesso

	Differenza M/F per fasce di età				
	<29	30-39	40-49	50-59	60-69
Albumina (g/dl)	0,1	0,1	0	0	-0,1
Bilirubina (mg/dl)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Calcio (mg/dl)	0,1	0,1	0,1	-0,1	-0,2
Colesterolo (mg/dl)	-14	2	6	-16	-34
Creatinina (mg/dl)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
Glucosio (mg/dl)	5	3	6	0	6
Acido urico	1,5	1,7	1,7	1	0,5



L'etnia è legata a fattori ambientali (zona di origine o in cui si vive) e socio-culturali (alimentazione, lavoro, stili di vita).

Alcune caratteristiche etniche permangono anche dopo trasferimento dal paese di origine: ad esempio le gamma-globuline negli africani e afroamericani sono più alte fino al 40% per le IGG e fino al 20% per le IGA.

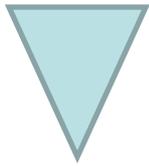
Nell'etnia africana sono più alti gli enzimi muscolari (CK, LDH, AST, ALT).

La tolleranza glucidica è inferiore negli afroamericani, polinesiani, eschimesi, nativi americani rispetto ai caucasici.

Le lipoproteine sono più elevate negli africani.

# Fase post-analitica

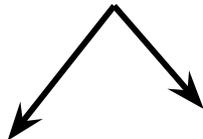
VALIDAZIONE: atto con cui il personale si assume la responsabilità della validità del dato analitico e/o dell'intero referto.



Stampa e trasmissione  
referto



Conservazione dei campioni e  
archiviazione dei referti



RIAPERTURA DEL CONTRATTO