



OSPEDALE S.PAOLO
Azienda Ospedaliera - Polo Universitario
via di Rudini` 8 - 20142 Milano

LABORATORIO DI CHIMICA CLINICA E MICROBIOLOGIA
Direttore Prof. Gian Vico Melzi d'Eril



MANUALE DI LABORATORIO

INTRODUZIONE

Scopo di questo manuale è fornire un elenco completo degli esami eseguiti presso il Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia dell'ospedale S.PAOLO e tutte le informazioni necessarie per garantire un corretto svolgimento delle fasi svolte fuori dal laboratorio, ma indispensabili alla produzione di risultati analitici attendibili.

Le fasi esterne al Laboratorio contemplano: la scelta degli esami da richiedere, la preparazione del paziente, la scelta dei contenitori e l'esecuzione del prelievo, le modalità di conservazione e di trasporto in Laboratorio, i criteri di valutazione dei risultati.

COME MINIMIZZARE GLI ERRORI DELLA FASE PREANALITICA

Molti fattori, oltre a quelli dovuti alla patologia che si vuole indagare, possono essere causa di variazioni nella composizione dei liquidi biologici: alcuni intervengono durante il procedimento analitico, e sono di regola tenuti sotto controllo con i Programmi di Controllo di Qualità (ormai obbligatori per tutti gli esami), altri intervengono durante la cosiddetta fase preanalitica. Questi ultimi possono essere limitati soltanto attenendosi con scrupolo ai protocolli di comportamento e sono pertanto più difficili da controllare perché spesso dovuti ad errore umano individuale.

Si rende perciò indispensabile che il personale sanitario, che richiede esami e che è preposto alla raccolta dei campioni biologici, sia consapevole delle fonti di errore e di variabilità, in modo da ridurle al minimo nella fase di raccolta e/o di tenerne conto nell'interpretazione del risultato.

1. Variazioni fisiologiche individuali

Vengono sotto elencati i più importanti fattori fisiologici causa di variazione:

- Dieta
- Posizione
- Esercizio fisico
- Stress mentale
- Gravidanze
- Variazioni ritmiche
 - diurne
 - ciclo mestruale
 - cicli circadiani
 - cicli circannuali

Dieta

E' importante tenere in considerazione la dieta che il paziente pratica, in quanto l'ingestione recente di alimenti può dar luogo a variazione di concentrazione per alcuni analiti. Per esempio la concentrazione dei trigliceridi aumenta dopo il pasto e torna al valore basale dopo 8 – 10 ore. In seguito all'assorbimento dei grassi il plasma acquista una torbidità più o meno marcata; per questo motivo è meglio prelevare il sangue per qualunque analisi nello stato di digiuno del paziente. E' tuttavia consentito, nella stragrande maggioranza dei casi, bere acqua o una tazza di tè leggero non zuccherato.

In ogni caso è importante chiedersi se i risultati degli esami possano essere influenzati all'ingestione di alimenti ed eventualmente consultare il laboratorio.

E' importante ricordare che anche il digiuno prolungato ha effetti biologici quali l'alterazione della produzione di molti ormoni e la caduta dei livelli di proteine, lipidi ed elettroliti del siero.

Stress fisici e psichici

Posizione: esercita un effetto significativo su alcuni risultati di laboratorio. Tali risultati possono essere differenti a seconda che il soggetto si trovi in posizione eretta, seduto o sdraiato al momento del prelievo (per es. variazione delle proteine plasmatiche del 5 – 10%); infatti la distribuzione dei fluidi tra lo spazio extra ed intra vascolare è dipendente anche dalla posizione.

Esercizio fisico: soprattutto se di notevole entità (es. la corsa) può influire su diversi analiti quali acido lattico, CK, LDH, AST. E' bene quindi che il paziente ambulatoriale non effettui esercizi fisici strenui nei giorni precedenti il prelievo.

Stress psicologico: può causare alterazioni di alcuni parametri biochimici (es. la prolattina). E' quindi importante assicurare al paziente una condizione il più possibile tranquilla.

Variazioni ritmiche

Alcuni analiti biochimici subiscono fluttuazioni nell'arco delle 24 ore (per esempio la concentrazione di ferro risulta più alta al mattino rispetto al pomeriggio). Per evitare questa fonte di variabilità sarebbe buona norma eseguire il prelievo di sangue nelle ore del mattino. Infatti gli intervalli di riferimento normalmente corrispondono a prelievi eseguiti al mattino e quindi la valutazione di risultati "anormali" ottenuti in altre ore può essere difficoltosa.

Inoltre è importante ricordare che durante il ciclo mestruale si verificano variazioni oltre, che delle concentrazioni ormonali, anche di parametri non strettamente correlati al ciclo mestruale (es. livelli di colesterolo più bassi in fase luteinica).

2. Fonti di variabilità relative alla raccolta del campione

Le principali fonti di variabilità nella raccolta del campione sono:

- Mancato controllo del rispetto della dieta da parte del paziente
- Applicazione prolungata del laccio
- Contaminazione da infusione venosa
- Emolisi
- Incompleto riempimento della provetta
- Uso di provette con anticoagulanti e conservanti non idonei
- Errata identificazione del paziente
- Errata etichettatura delle provette
- Mancata indicazione del tipo di prelievo (arterioso, venoso, ecc)
- Mancata indicazione di data e ora del prelievo

Effetto del laccio: il laccio facilita la raccolta del campione, ma è anche causa di una emocostrazione artificiale. Anche dopo un solo minuto di applicazione del laccio si verifica un aumento di concentrazione delle proteine e delle sostanze ad esse legate; dopo 3 minuti l'aumento raggiunge una percentuale dell'8 – 10%. Un'applicazione più prolungata ha come effetto l'aumento di lattato, ammonio, ecc; effetto ancora più pronunciato se il laccio viene rilasciato durante il prelievo di sangue.

Contaminazione da infusione venosa: Il prelievo di sangue dallo stesso braccio in cui il paziente riceve liquidi per via endovenosa, può essere causa di contaminazione. E' quindi preferibile effettuare il prelievo dal braccio controlaterale.

Emolisi: è causata da un flusso turbolento del sangue e comporta il rilascio di alcune sostanze intracellulari come enzimi (es LDH), potassio, magnesio e fosfato. Inoltre l'emoglobina, fuoriuscita dai globuli rossi, colorando il siero ed il plasma può andare ad interferire con diversi metodi analitici. Per questi motivi è importante per il prelievo scegliere l'ago della misura idonea, evitare di togliere la provetta da vuoto prima che sia stata riempita e di prelevare con siringa per poi travasare

il sangue nelle provette sottovuoto espellendolo dalla siringa con ago innestato. Altra causa di emolisi può essere l'aspirazione involontaria attraverso l'ago di disinfettanti se utilizzati in eccesso.

Uso di provette con anticoagulanti e conservanti non idonei e/o inquinamento: nonostante l'uso corretto dei sistemi sottovuoto dovrebbe garantire da questo tipo di errore non è raro che questo succeda se vengono compiute operazioni errate (esempio: riempimento da siringa tradizionale previa apertura del tappo o foratura del tappo in gomma con l'ago di prelievo, riempimento incompleto, ecc.). In proposito si rammenta che gli anticoagulanti abitualmente in uso (EDTA potassico – eparina – citrato di sodio) anche in piccolissime quantità possono interferire molto pesantemente sui livelli di concentrazione di alcuni analiti (sodio, potassio, calcio, fattori della coagulazione,...).

3. Fonti di variabilità relative al tempo tra prelievo e fase analitica

Il materiale prelevato va inviato prima possibile al Laboratorio, ma se ciò non fosse possibile, va trattato e conservato secondo adeguate modalità, in modo da evitare modificazioni in vitro che possono influire significativamente sul risultato delle analisi. Sono noti, infatti, gli effetti della conservazione a temperatura ambiente di alcuni analiti, quali acido lattico e ammonio, per tempi anche brevi. Inoltre lasciando i campioni a temperatura ambiente per tempi più lunghi si osserva una diminuzione della concentrazione di glucosio per il metabolismo cellulare ed un aumento della concentrazione plasmatica di analiti ad elevata concentrazione citoplasmatica quali LDH, AST, potassio e fosfati.

Vengono ora riportate delle norme generali di conservazione del campione (valide anche per eventuale consegna differita al Laboratorio) da seguire nel caso in cui nella scheda dell'analita di interesse non siano specificamente riportate altre istruzioni:

Analisi eseguita su sangue intero: conservare in frigorifero (4° C). Evitare se è previsto il dosaggio del potassio.

Analisi eseguita su siero o plasma: centrifugare la provetta (per le analisi su siero prima della centrifugazione deve essere avvenuta completamente la coagulazione) travasare il siero o il plasma in una seconda provetta, adeguatamente contrassegnata, da conservare in frigorifero.

Analisi eseguita su urina:

Prime urine del mattino: urine emesse al risveglio. E' quasi sempre opportuno raccogliere il "secondo mitto". Pertanto: buttare il primo getto che è stato a stretto contatto con le basse vie urinarie e i genitali esterni e raccogliere la seconda parte del getto che proviene dalla vescica.

Seconde urine: urine raccolte durante la seconda minzione del mattino, solitamente meno concentrate delle prime.

Raccolta temporizzata (24h, 12h, 2h): è sempre necessaria per una valutazione quantitativa dell'analita in esame. All'inizio della raccolta urinare e gettare tutta l'urina emessa; successivamente raccogliere tutta l'urina prodotta per tutto il tempo relativo alla raccolta in un recipiente pulito e capiente (almeno 2 litri per la raccolta di 24h). Terminare la raccolta con l'ultima minzione esattamente alla scadenza del tempo di raccolta.

Durante la raccolta mantenere il recipiente in un luogo fresco e scuro; consegnare tutto il quantitativo in laboratorio scrivendo il tempo di raccolta; alternativamente misurare con esattezza la quantità raccolta dopo averla accuratamente miscelata e consegnare un campione in provetta o barattolo scrivendo tempo di raccolta e quantità misurata. Il campione consegnato per essere rappresentativo di tutta la raccolta dovrà essere frutto di una miscelazione accurata.

4. Norme per gli esami colturali

La finalità delle indagini batteriologiche (e micologiche) è quella di ricercare, in modo rapido ed accurato, gli agenti responsabili di processi infettivi, con il duplice scopo di identificarli e di determinare la sensibilità agli antibiotici.

Per garantire la significatività dei risultati, il microbiologo deve disporre di materiale (proveniente dalla sede del processo morboso) che contenga i microrganismi responsabili. I campioni da esaminare devono, pertanto, essere prelevati seguendo scrupolosamente le istruzioni che seguono.

➤ **La raccolta dei materiali deve avvenire prima dell'inizio della terapia antibiotica**

La ricerca di un microrganismo, effettuata dopo la somministrazione di farmaci atti a distruggerlo (antibiotici), è un'operazione irrazionale e contraddittoria. Anche nei casi, infatti, in cui la terapia antibiotica non ha determinato la completa distruzione dell'agente patogeno, è probabile che il farmaco contenuto nel materiale patologico eserciti nel terreno di coltura una prolungata attività, impedendo lo sviluppo e quindi l'evidenziazione del germe in causa.

Se il paziente è sottoposto a trattamento antimicrobico e non è possibile interrompere la terapia occorre avvertire tempestivamente il laboratorio, che ove possibile attuerà alcuni accorgimenti tecnici che possono attenuare l'azione antimicrobica del farmaco e favorire l'isolamento del germe.

➤ **La raccolta deve essere effettuata sterilmente nella sede anatomica del processo morboso**

Escludendo i casi in cui il microrganismo esercita la sua azione patogena attraverso esotossine (tetano, botulismo,...), infatti la presenza di microrganismi nella sede anatomica del processo morboso permette, se si può escludere una contaminazione esogena o endogena del campione, di attribuire significato eziologico agli stipti isolati.

➤ **Occorre evitare ogni contaminazione esogena o endogena del campione.**

Il microbiologo non è in grado di distinguere, salvo situazioni particolari, se i microrganismi isolati sono gli agenti causali del processo morboso ovvero rappresentano una flora di inquinamento.

La patologia infettiva è oggi, soprattutto in ambiente ospedaliero, spesso sostenuta da "patogeni facoltativi" che, a differenza dei patogeni classici, fanno parte della flora residente di alcuni distretti corporei o dell'ambiente esterno.

I microrganismi presenti nell'ambiente possono contaminare i campioni se la loro raccolta non viene eseguita con modalità rigorosamente aseptiche (contaminazione esogena).

La flora residente di taluni distretti corporei può inquinare il materiale patologico al momento della sua emissione o durante il prelievo (contaminazione endogena): ciò avviene, ad esempio, per l'essudato bronchiale ad opera della flora oro-faringea nella fase di espettorazione; per l'urina ad opera dei batteri dei genitali esterni durante la minzione, per il sangue o gli essudati ad opera della flora cutanea al momento del prelievo.

In tutte queste situazioni è difficile chiarire con sicurezza il significato eziologico degli stipti isolati.

➤ **Il trasporto dei campioni in microbiologia deve avvenire in tempi e condizioni che non alterino le caratteristiche microbiologiche del materiale patologico.**

La prolungata conservazione può causare la morte dei batteri meno resistenti; inoltre talune specie (inquinanti e non), possono moltiplicarsi a spese di altre, alterando il naturale rapporto quantitativo fra le varie componenti microbiche del materiale e causando valutazioni errate.

Se per ragioni organizzative, logistiche o di altra natura non è possibile inoltrare immediatamente i campioni al Laboratorio è indispensabile utilizzare adeguati terreni di trasporto e/o provvedere alla conservazione dei materiali secondo i protocolli in uso .

MODALITA' DI ACCESSO ALL'AMBULATORIO PRELIEVI PER L'UTENZA AMBULATORIALE

- I prelievi si effettuano dal lunedì al venerdì dalle ore 7.45 alle ore 9.30 senza prenotazione negli ambulatori dell'Ospedale San Paolo (Blocco D piano T), di via Gola 22 e di via Baroni 48
- Si dovrà essere muniti di impegnativa del medico curante o di un medico specialista del nostro Ospedale (con il timbro dell'ambulatorio e del medico richiedente completo di codice fiscale), tessera sanitaria ,eventuale tesserino di esenzione per patologia e autocertificazione (per gli aventi diritto).
- I Sigg. Pazienti che devono consegnare solo del materiale (urine, feci, espettorati, ecc) e coloro che necessitano di CURVA GLICEMICA devono recarsi direttamente allo sportello dedicato senza dover prendere il bigliettino con il numero. Il profilo glicemico che prevede anche il prelievo nel pomeriggio può essere effettuato dal lunedì al giovedì (non il venerdì)
- I Pazienti che hanno diritto all'esenzione del Ticket (per motivi diversi da Patologia e Invalidità: per disoccupazione, per età con redditi inferiori a quanto stabilito dalla legge, per indigenza, ecc..) dovranno compilare l'apposito modulo di autocertificazione e consegnarlo agli operatori degli sportelli all'atto dell'accettazione.
- I referti degli esami potranno essere ritirati agli sportelli dedicati dalle ore 11.30 alle ore 16.00 (con orario continuato) sempre dal lunedì al venerdì, a partire dal giorno indicato sul foglio del ritiro. Il giorno indicato si riferisce al referto completo di tutti gli esami richiesti; dal momento che soltanto alcuni esami richiedono tempi lunghi si consiglia in caso di necessità di prendere accordi con la segreteria per il ritiro di un referto parziale.
- Il pagamento del ticket potrà essere effettuato al momento dell'accettazione degli esami o al momento del ritiro del referto.

ORGANIZZAZIONE DEL MANUALE

Il presente manuale è composto da schede contenenti informazioni riguardanti ogni analisi eseguita in presso il Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia. Per le analisi eseguite in laboratorio d'urgenza è inserita una scheda specifica.

Le **schede sono in ordine alfabetico** ed in particolare sono identificate come:

- Sostanza (es. Colesterolo)
- Microrganismo (es. Virus Epatite C Anticorpi)
- Anticorpo (limitatamente ad autoimmunità: es. Anticorpi anti Nucleo)
- Materiale (es. Sangue Coltura)
- Patologia (limitatamente a Biologia Molecolare genetica: es. Morbo di Wilson-screening molecolare)

Per ogni analisi viene riportato:

Codice del Sistema informatico ospedaliero

Codice SSN: riporta i codici del DM 22/07/96 e successive modificazioni

Sistema: tipo di campione (materiale biologico) in sigla

Intervallo di riferimento e unità di misura:

Intervallo di riferimento

Per convenzione l'intervallo di riferimento comprende il 95% centrale della distribuzione di riferimento, definita trattando statisticamente i valori analitici ottenuti su un gruppo campione rappresentativo di una popolazione di riferimento. L'ampiezza della distribuzione dipende dalla variabilità biologica interindividuale.

Sotto la voce "Intervallo di riferimento" possono essere riportati:

- l'intervallo di riferimento (95% centrale della distribuzione) o il suo limite superiore (97,5° percentile)
- l'intervallo terapeutico (per i farmaci)
- il valore decisionale o raccomandato (stabilito da convenzioni accettate dalle principali organizzazioni o società scientifiche)
- valutazioni qualitative (negativo, assente,...)

Tali indicazioni, ove non specificato, si riferiscono all'età adulta.

Unità di misura

Vengono riportate le unità di misura in uso, che si riferiscono, ovviamente, sia ai risultati che alle indicazioni degli "intervalli di riferimento". In allegato sono riportate le indicazioni utili per la trasformazione della Unità di misura in uso presso questo Laboratorio in Unità del Sistema Internazionale di misura (SI) ed in altre unità di misura di uso frequente (UI).

Provette in uso: per ogni analisi viene riportato il tipo di provetta (volume, colore etichetta, colore tappo) o di contenitore (per le analisi microbiologiche)

Frequenza di esecuzione e tempo di risposta: viene riportata la frequenza con cui l'analisi viene eseguita e il tempo necessario per il completamento dell'analisi stessa (dipendente anche dai tempi di lavorazione).

Settore e numero telefonico interno: viene specificato il Settore del Laboratorio in cui l'analisi viene eseguita e il relativo numero telefonico interno

Preparazione del paziente/ modalità di prelievo: per tutte le analisi biochimiche e sierologiche valgono le norme di validità generale riportate nel paragrafo 1 e 2 dell'introduzione, mentre per le analisi microbiologiche ci si deve riferire al paragrafo 4.

Dove necessario sono riportate indicazioni specifiche

Conservazione del campione: se non vi sono indicazioni specifiche ci si deve riferire al paragrafo 3 dell'introduzione per le analisi biochimiche e sierologiche e al paragrafo 4 per le analisi microbiologiche. Le informazioni fornite riguardano le modalità di trattamento e conservazione del campione prima della consegna al Laboratorio.

Metodo analitico utilizzato

Note

A completamento del manuale sono presenti due **Allegati:**

1. Elenco delle Abbreviazioni e dei Sinonimi

2. Variabilità biologica, variabilità analitica e differenze critiche

Per gli analiti di chimica clinica sono riportati, se disponibili, i seguenti dati:

- variabilità intraindividuale (Bw)
- variabilità tra individui (Bb)
- il target di imprecisione proposto a livello Europeo (Fraser C, Thienpont L, Hyltoft Petersen P, Ricos C, Stockl D, Libeer JC, Baadenhuijsen H, "Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory." Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:983-999)
- la variabilità analitica attuale del nostro Laboratorio di Chimica Clinica (Va)
- le differenze critiche calcolate (Dcr) (per $P=0,95 \rightarrow Dcr=2,77 \times \sqrt{Va^2+Vbw^2} = 2.77 \times V_{totale}$) (la differenza critica è la massima differenza imputabile alla variabilità totale, conseguente all'effetto combinato di quella analitica e quella biologica, per un livello di probabilità statistica stabilito)

Le variabilità e le imprecisioni sono espresse come CV% (= dev.st./media×100)

Le variabilità biologiche riportate risultano dalla media dei CV%, riportati in letteratura

(www.westgard.com/biobank3.htm)

3. Unità di misura

Vengono riportate le unità di misura in uso, che si riferiscono, ovviamente, sia ai risultati che alle indicazioni degli "intervalli" di riferimento. In allegato sono riportate le indicazioni utili per la trasformazione della Unità di misura in uso presso questo Laboratorio in Unità del Sistema Internazionale di misura (SI) ed in altre unità di misura di uso frequente (UI).

Elenco delle sigle per identificare il materiale biologico su cui vengono eseguite le analisi:

| | |
|-------|------------------------------------|
| EX-- | Espettorato |
| F-- | Feci |
| LA-- | Liquido Amniotico |
| LAS-- | Liquido Ascitico |
| LCR-- | Liquido Cefalorachidiano (Liquor) |
| LP-- | Liquido Pleurico Colturale |
| LPE-- | Liquido Pericardico Es.e Chim.Fis. |
| LS-- | Liquido Seminale |
| LSn-- | Liquido Sinoviale |
| P-- | Plasma |
| PB-- | Prelievo Bioptico Colturale |
| Pt-- | Paziente |
| Pus-- | Pus |

S-- Siero
Sg-- Sangue
SP-- Secreto Prostatico
TAu-- Tampone Auricolare
TC-- Tampone Cutaneo
TCg-- Tampone Congiuntivale
TF-- Tampone Faringeo
TL-- Tampone Colturale Linguale
TN-- Tampone Nasale
TO-- Tampone Ombelicale
TU-- Tampone Uretrale
TV-- Tampone Cervicale Vaginale
U-- Urine

NUMERI TELEFONICI INTERNI DEL LABORATORIO ANALISI

Segreteria: 4453

Direttore: 4263

ViceDirettore: 4314

Capotecnico: 4245

Settore Biochimica: 4236

Settore Sierologia: 4237

Settore Microbiologia: 4605

Settore Biologia Molecolare: 4257

Settore Urgenza: 4233

Analisi decentrate: 4684

