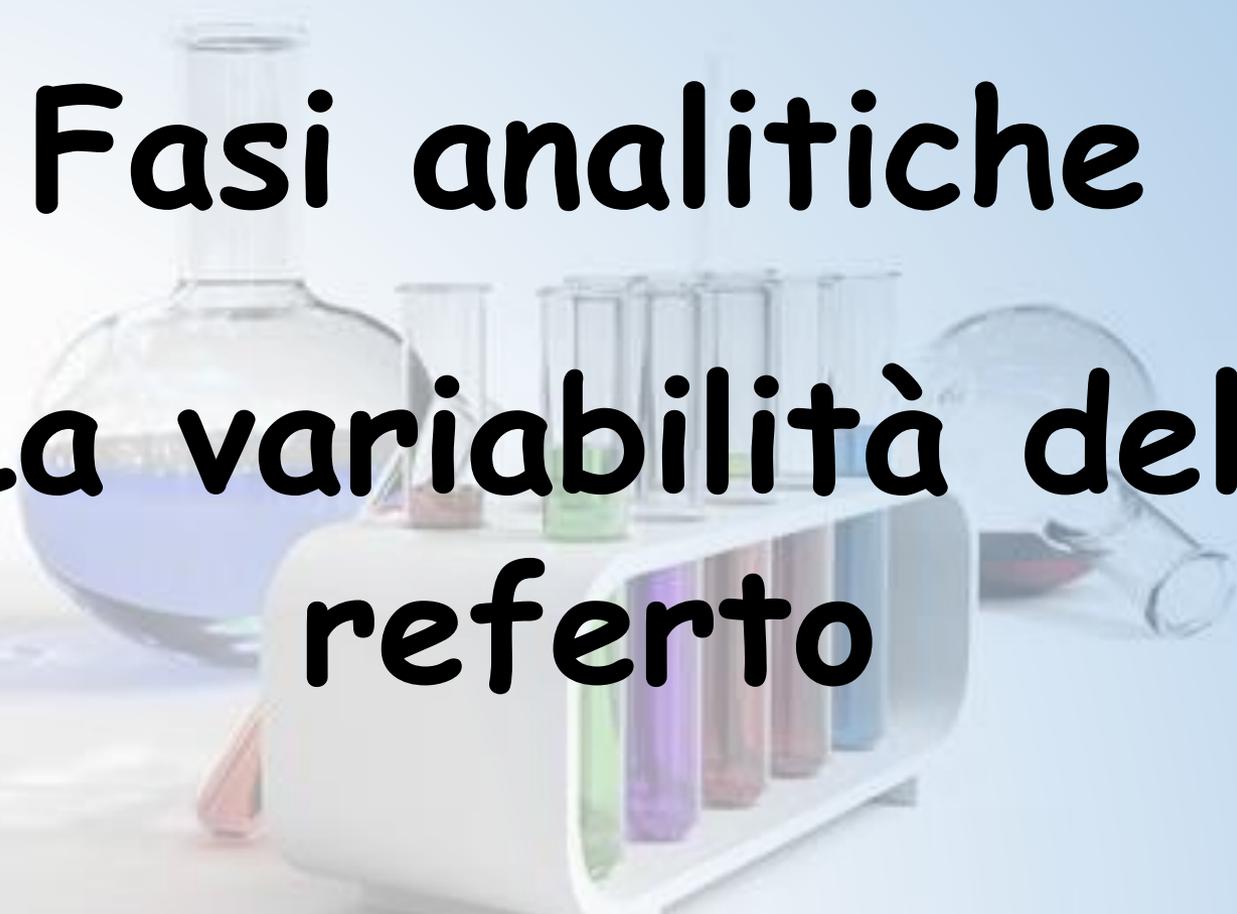




Corso di laurea in Infermieristica (0530)

Insegnamento: Scienze Biochimiche e biologiche

Modulo: Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica



Fasi analitiche

La variabilità del referto

Modulo: Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

- Il referto di laboratorio esprime con un **risultato** che il medico richiedente deve interpretare confrontandolo con i valori di riferimento.
- Il dato finale può essere **influenzato** da numerosi fattori mal controllabili o mal controllati.
- Alcuni di questi sono legati al **paziente**, altri alla **conservazione dei campioni** ed altri ancora ai **metodi di analisi**.



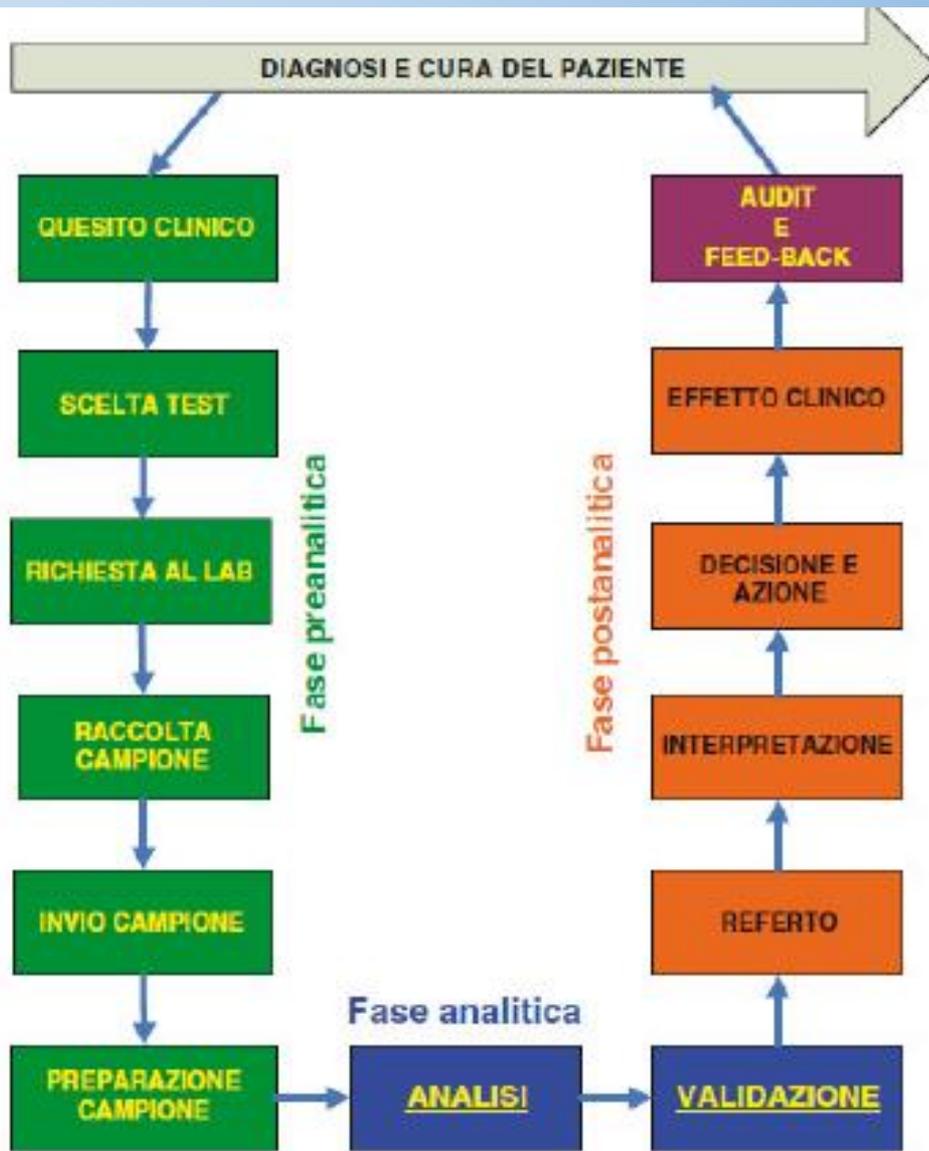


Figura 4.5

Le fasi principali del ciclo analitico, dalla richiesta al referto: la parte a sinistra (in verde) rappresenta la fase preanalitica, con le tre azioni principali, prelievo, trasporto, conservazione e preparazione del campione in attesa dell'analisi. Nella parte inferiore (in blu) è rappresentata la fase analitica, suddivisa in analisi, controlli di qualità e validazione, con iteratività in caso di mancata validazione. A destra le varie attività relative alla fase postanalitica.

3 fasi per elaborare un RISULTATO:

- 1. **Fase pre-analitica**: comprende tutta una serie di operazioni che iniziano dal prelievo del campione fino al suo posizionamento sull'analizzatore
- 2. **Fase analitica**: rappresenta la parte dell'esecuzione effettiva dei tests
- 3. **Fase post-analitica**: comprende la raccolta ed elaborazione dei risultati e la conseguente emissione del referto.

- Per quanto riguarda la preparazione e la conservazione dei campioni biologici esiste:

1. variabilità pre-analitica

- variabilità legata al paziente
- variabilità legata alla conservazione del campione



2. variabilità analitica

- legata al metodo di analisi



3. variabilità post-analitica

- legata al dato

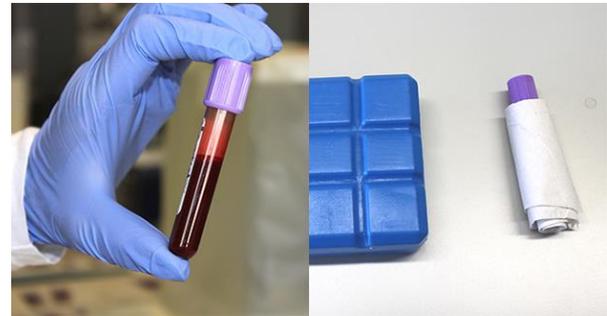


VARIABILITA' PRE-ANALITICA

1. Variabilità pre-analitica

Questo insieme di procedure è rappresentato da:

- Preparazione del paziente**
- Raccolta del materiale**
- Prelievo del materiale**
- Trasporto o spedizione**
- Separazione (siero, plasma)**
- Conservazione del campione.**



VARIABILITÀ PRE-ANALITICA LEGATA AL PAZIENTE

- ✓ A maggior variabilità corrisponda maggior difficoltà interpretativa dei risultati.
- ✓ **Non** è possibile **eliminare** la variabilità, si può solamente tentare di restringerne i limiti.
- ✓ Esiste una variabilità **individuale** → non è in alcun modo eliminabile né conoscibile a priori.
- ✓ Per ridurla, la popolazione può essere **raggruppata in classi omogenee** come, ad esempio, i maschi e le femmine, gli adulti e i bambini, etc.

VARIABILITÀ PRE-ANALITICA LEGATA AL PAZIENTE

- ✓ Una sorgente notevole di variabilità è costituita dal fatto che il paziente, specialmente quello **ambulatoriale**, ben **difficilmente** è **standardizzato** quanto ad:
 - ❖ abitudini alimentari
 - ❖ assunzione di farmaci
 - ❖ attività fisica, etc.
- ✓ A volte può essere difficile comprendere che l'origine di un dato apparentemente anomalo possa dipendere da una di queste cause.



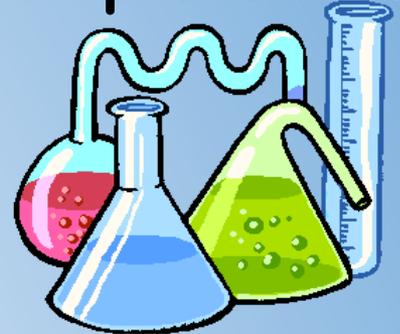
VARIABILITÀ PRE-ANALITICA LEGATA AL PAZIENTE

- ✓ L'assunzione di **farmaci** può essere importante anche perché può sfuggire all'indagine anamnestica.
- ✓ Il paziente **riferisce** infatti prevalentemente quello che lo colpisce
- ✓ Bisogna compiere un **interrogatorio** più accurato per scoprire fatti che secondo il paziente non sono importanti ed ai quali non ha prestato molta attenzione (un farmaco che ha "**sempre assunto**", che ritiene innocuo, ecc.).
- La **dieta** è un altro importante agente di variabilità.
- Per questo motivo i prelievi vengono generalmente eseguiti dopo un periodo di digiuno di 6-8 ore.
- Vi sono certi tipi di analisi che richiedono una **dieta particolare** per un certo periodo di tempo prima dell'esecuzione, come, ad esempio le prove da **carico con glucosio** o la ricerca del sangue occulto nelle feci.



VARIABILITÀ PRE-ANALITICA LEGATA AL PAZIENTE

- ▣ La **postura**, il **riposo fisico** ed **altre condizioni** possono pure influenzare i risultati dell'analisi.
- ▣ Ad esempio l'attività fisica può far aumentare la concentrazione ematica di alcuni enzimi di provenienza muscolare, come la creatinasi (**CK**).



✓ Variabilità → **ritmi biologici**

- In natura sono comuni quelli circadiani (alternanza luce buio) od anche quelli circamensili (ciclo mestruale).
- Es. le variazioni circadiane del **cortisolo plasmatico**, che vengono proprio sfruttate a scopo analitico per valutare il controllo della funzione surrenale.

VARIABILITÀ PRE-ANALITICA LEGATA AL PAZIENTE

- **Non esiste** purtroppo una **regola generale** ed unica che ci permetta di evitare questi inconvenienti.
- E' buona norma seguire **protocolli concordati** nel laboratorio in modo da ridurre al minimo la variabilità e le possibilità di errori interpretativi.



biochimica clinica e biologia molecolare e clinica

Effetto dell'età sui test di laboratorio

- Ci sono svariati test di laboratorio che hanno **intervalli di normalità** diversi per pazienti di diverse età.
- Ciò è particolarmente importante in Pediatria.
- I neonati soprattutto hanno molti intervalli di normalità differenti rispetto agli adulti o a bambini più grandi per le sostanze nel sangue ed altri fluidi corporei.

□ Esempi:

- molti dei fattori della coagulazione non raggiungono i livelli dell'adulto per molti mesi dopo la nascita
- il livello del colesterolo aumenta con l'età.



Effetto del sesso sui test di laboratorio

- Il genere ha un impatto significativo su molti test di laboratorio.
- **Testosterone** ed **estradiolo** sono esempi evidenti.
- Tra le donne ci sono variazioni sieriche di vari ormoni durante il **ciclo mestruale**

Effetto della massa corporea sui test di laboratorio

- La massa muscolare può influenzare il livello di certi composti, come la creatina chinasi nel sangue.
- E' anche noto che vi è un aumento del livello sierico di colesterolo con l'obesità, perché il livello di colesterolo è legato alla quantità di grasso corporeo.

Preparazione del paziente per le analisi di laboratorio

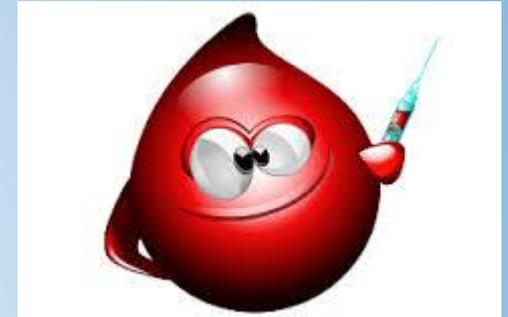
- Per alcuni esami di laboratorio, ci sono diverse preparazioni particolari del paziente, che sono necessarie per fornire i risultati clinicamente più utili, accurati e precisi.
- Una delle preparazioni del paziente più frequenti è il **DIGIUNO**, di solito da 8 a 12 ore, a seconda del test.
- Il livello di **trigliceridi** nel siero può essere influenzato dall'alimentazione, e il digiuno è assolutamente necessario.
- Un altro test per il quale è richiesto il digiuno è la **glicemia**, esame eseguito per la valutazione di diabete in un paziente.

Postura del paziente per il prelievo di sangue

- La postura del paziente può influenzare il risultato di alcuni test.
- Vi è un **volume plasmatico inferiore** quando il paziente è in **posizione verticale** perché c'è una raccolta di liquidi nelle parti inferiori del corpo quando si sta in piedi.
- Quando il paziente è in **posizione supina**, c'è un ritorno di liquidi dai tessuti alla circolazione.

- Il volume extra in circolo può diluire alcuni composti nel sangue.

- E' meglio monitorare il paziente nella **stessa posizione posturale** se il risultato del test è modificabile dalla postura e se i valori devono essere confrontati tra loro nel tempo.



Differenze nei risultati tra i campioni di sangue venoso, arterioso e capillare

- Il sangue venoso può avere una diversa concentrazione di un analita rispetto al sangue arterioso.
- Il miglior esempio è costituito dai **gas** presenti nel sangue → notevoli differenze tra sangue arterioso e venoso a causa dello scambio di gas nei polmoni.
- E' possibile osservare anche una differenza tra **sangue capillare e sangue arterioso e venoso.**
- -----
- I valori della **glicemia** possono differire in modo significativo nei campioni da capillari (punta del dito) → il glucosio si ripartisce diversamente fra plasma (di più) e globuli (di meno). La presenza di globuli abbassa la media.

VARIABILITA' LEGATA AL PRELIEVO ED ALLA CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

- ✓ Si possono prelevare **diversi fluidi**, secrezioni o tessuti
- ✓ Più comunemente si prelevano **sangue e urine**.
- ✓ Nel caso del **sangue**, si preleva con maggior frequenza il sangue **venoso**.
- ✓ Il prelievo di sangue deve essere effettuato in presenza di **anticoagulanti o conservanti**.
 - ▣ Non esiste un anticoagulante o un preservante **universale**
 - ▣ E' necessario usare anticoagulanti o preservanti diversi a seconda del tipo di analisi.
 - ▣ In generale, quanto **più a lungo** il campione deve essere conservato tanto maggiori sono le probabilità di alterazioni determinate da varie cause.

VARIABILITA' LEGATA AL PRELIEVO ED ALLA CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

- ▣ Alcune di queste come l'evaporazione del solvente, la fotolisi, la polimerizzazione, ecc. sono di natura fisica o chimico fisica.

- ▣ Molto più importante è la **denaturazione**, poiché proteine denaturate variano la loro capacità catalitica e quindi possono essere falsati i risultati di dosaggi enzimatici.
 - Spesso le **cause** di alterazione sono **metaboliche o biologiche** come:
 - ✓ la presenza di batteri
 - ✓ la modificazione dei gradienti di concentrazione
 - ✓ alcuni metabolismi possono continuare anche dopo il prelievo facendo di conseguenza variare le concentrazioni di alcuni **analiti**.

VARIABILITA' LEGATA AL PRELIEVO ED ALLA CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Per ovviare a questi problemi è possibile:

- ▣ aggiungere conservanti
- ▣ conservare i campioni al freddo e/o al buio
- ▣ eseguire i dosaggi prima possibile

A parte l'ultimo espediente che presenta il solo problema dell'organizzazione e del tempo richiesto per il trasporto ai centri di analisi, tutti gli altri presentano dei pro e dei contro.

VARIABILITA' LEGATA AL PRELIEVO ED ALLA CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

E' opportuno prelevare il campione biologico con **modalità diverse** a seconda delle analisi o dei gruppi di analisi che si intendono effettuare.

✓ Emolisi:

- è una delle cause che possono portare ad alterazioni importanti dei risultati analitici
- il **passaggio di sostanze dai globuli al plasma** può alterare i risultati.
- Un caso classico è quello del **potassio**, più concentrato nelle cellule che al di fuori di esse (K è dalle 10 alle 14 volte maggiore all'interno)
- L'emolisi può essere determinata da diverse cause:



VARIABILITA' LEGATA AL PRELIEVO ED ALLA CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

- a) **Chimica** → presenza di acqua, alcool, detergenti, nell'ago, nella siringa o nei contenitori.
- b) **Meccanica** → in particolare quando si travasa il sangue dalla siringa alle provette senza togliere l'ago.
- c) **Fisica** → è provocata dalla conservazione prolungata del campione in condizioni poco idonee (troppo caldo o troppo freddo, congelamento del sangue)
- d) **Biologica** → in presenza di difetti dell'eritrocita.

VARIABILITA' LEGATA AL PRELIEVO ED ALLA CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Le prime due cause di emolisi sono oggi ovviate dall'uso di **vacutainers** sotto vuoto.

Tutte vengono limitate dalla rapida separazione tra parte corpuscolata e plasma.



EVITARE

- Eccessivo scuotimento dei campioni
- Luce solare diretta.
-**perdita** di tempo!!!

CONSIGLIATI

- Gel separatori.
- Stabilizzanti per urina.
- Ghiaccio.
- Uso trans-bag

Criteri di non accettabilità dei campioni biologici

- ◆ Identificazione assente
- ◆ Identificazione incompleta
- ◆ Mancanza di informazioni necessarie per l'esecuzione dei test
- ◆ Contenitore inidoneo (non conforme alle indicazioni o necessità del laboratorio, non sterile e/o a imperfetta chiusura, non esente da metalli in tracce, ecc.)
- ◆ Contenitore non integro
- ◆ Prelievo non corretto (effettuato durante terapia infusione, senza impiego di terreni di trasporto, ecc.)
- ◆ Quantità insufficiente
- ◆ Rapporto sangue/anticoagulante inadeguato o scorretto
- ◆ Mancata aggiunta di idoneo conservante
- ◆ Presenza di coaguli (per esempio emocromo, test coagulativi)
- ◆ Emolisi evidente
- ◆ Conservazione a temperatura non corretta (emogasanalisi, ammoniemia, ecc.)
- ◆ Esposizione a luce solare diretta
- ◆ Congelamenti e scongelamenti ripetuti
- ◆ Paziente non a digiuno per esami come glucosio, lipidi, ecc.
- ◆ Paziente non sottoposto al previsto regime dietetico (per esempio sangue occulto)
- ◆ Paziente non a riposo per test in cui il riposo è indispensabile (per esempio dosaggio di renina)

Esempi errori pre-analitici:

- A.** Preparazione inadeguata del paziente (es. mancanza di digiuno per un particolare test in cui è richiesto il digiuno)
- B.** Ingestione di farmaci che interferiscono con gli esami di laboratorio
- C.** Raccolta del campione nella provetta sbagliata

Esempi errori pre-analitici:

- D.** Ritardo trasporto del campione al laboratorio
- E.** Stoccaggio del campione ad una temperatura non corretta
- F.** Raccolta di un'inadeguata quantità di sangue in provette sotto vuoto contenenti una quantità fissa di anticoagulanti.

Errori pre-analitici:

- Tutti questi errori si verificano prima che il campione arrivi per l'analisi e rendono impossibile fornire un risultato che rispecchi veramente la condizione del paziente, indipendentemente da quanto sia grande la precisione analitica all'interno del laboratorio

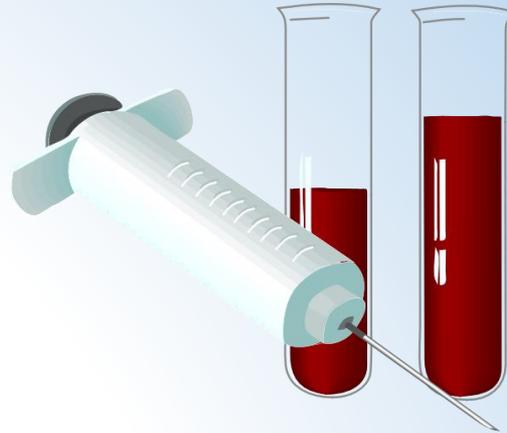
VARIABILITA' ANALITICA

Errori fase analitica

- **SECONDA**: fase analitica → momento in cui il campione viene analizzato nel laboratorio.
- Possono verificarsi errori durante questo processo, ma sono molto meno frequenti nel momento attuale, dato l'elevato livello automazione di molti strumenti di laboratorio.

Esempi errori fase analitica

a. Uso non corretto della strumentazione

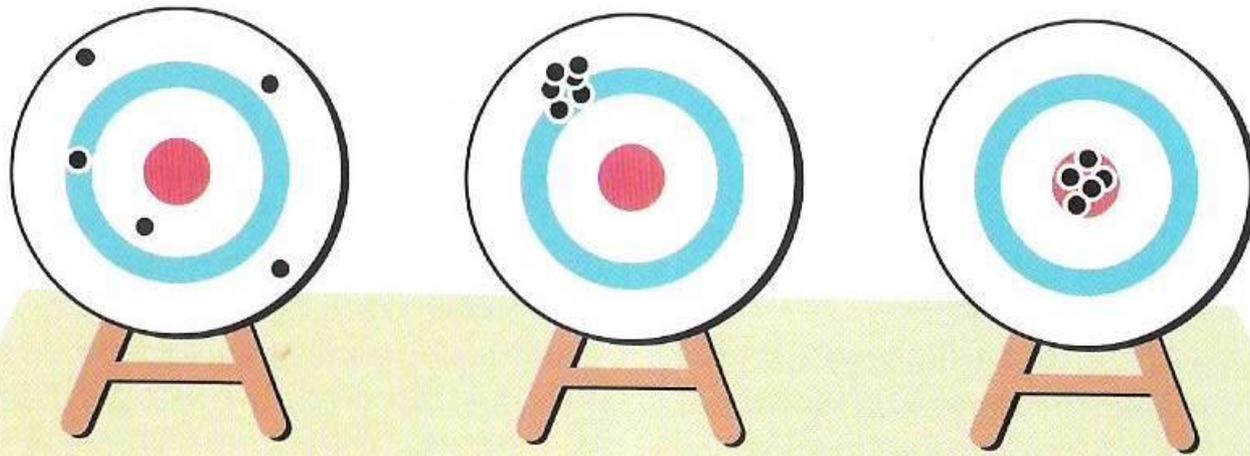


b. Uso di reagenti scaduti

2. Variabilità analitica

- ▣ La variabilità analitica è quella legata al metodo di analisi.
- ▣ L'attendibilità di un metodo analitico dipende da diversi fattori, tra cui:
 - ❖ **l'accuratezza**
 - ❖ **la precisione**
 - ❖ **la specificità**
- ▣ Questi concetti si esprimono meglio al negativo, per cui l'inaccuratezza di un metodo riflette l'errore sistematico e l'imprecisione quello casuale.

- Se vogliamo, possiamo pensare **ad un fucile da caccia a pallini**.
- **L'imprecisione** dà l'ampiezza della rosa
- **l'inaccuratezza** dà la distanza tra il punto colpito e quello mirato.



Impreciso

Preciso ma non accurato

Preciso e accurato

Fig. 2 Precisione e accuratezza.

- ❑ La sensibilità → è data dalla differenza minima delle quantità di una sostanza rilevabili in un campione.
- ❑ La **specificità** indica quanto il metodo distingue tra una sostanza e possibili sostanze interferenti.
- ❑ E' evidente che la **scelta di un metodo**, quando, come capita spesso, ne esistano più di uno, è legata a numerosi fattori.

- ▣ Un metodo dovrebbe essere il più accurato, preciso, sensibile, specifico (e poco costoso).
- ▣ La scelta è il frutto di un compromesso che tiene conto di tutti i fattori e dello scopo per cui deve venire impiegato.

IL CONTROLLO DELLA QUALITA'

- Un controllo che dovrebbe essere costantemente espletato è quello di come nel **singolo laboratorio** il metodo di analisi venga eseguito: vale a dire il controllo della qualità.
- E' evidente che le ragioni più varie, come errori casuali troppo frequenti o grandi, dovuti a distrazione, sbagli nel prelievo di campioni o di reagenti, possono rendere **inattendibili i risultati**.
- Più spesso, l'errore non è casuale (le procedure meccanizzate abbassano la probabilità di errore umano), ma è **sistematico**.
- Il metodo va fuori taratura per alterazioni di reagenti o di apparecchiature.
- E' quindi necessario tener d'occhio i metodi analitici effettuando il controllo di qualità, per la cui esecuzione esistono diversi procedimenti.

VARIABILITA' POST-ANALITICA

Errori fase post-analitica

- **TERZA**: fase post-analitica → inizia quando viene generato il risultato e termina quando il risultato viene riferito al medico.
- Errori più comuni degli errori analitici, ma meno comuni degli errori pre-analitici.
- ✓ Ritardo nel tempo di inserimento di un risultato completo nel sistema informativo del laboratorio
- ✓ Riferire i risultati per il paziente sbagliato

- La **qualità** post-analitica, ossia il controllo finale della qualità pre- ed intra-analitica, può essere considerata come la **qualità complessiva**.

□ **Comprende:**

- la qualità del quesito a cui si deve dare risposta
 - la qualità analitica raggiunta
 - l'utilità della risposta ottenuta
 - il contesto del paziente
 - la capacità percepita del medico di interpretare ed usare l'informazione del laboratorio.
-
- La fase post-analitica, analogamente a quella pre-analitica, può essere ulteriormente **divisa in:**
 - ✓ un fase che si svolge all'interno del laboratorio
 - ✓ una fase (fase post-post-analitica) in cui i medici ricevono, interpretano i risultati del laboratorio e ne sono influenzati.

Le procedure **post-analitiche** che si svolgono all'**interno** del laboratorio comprendono:

- ❖ la verifica dei risultati
- ❖ l'inserimento nel sistema informativo del laboratorio
- ❖ la loro comunicazione ai clinici in modi diversi (in particolare, con la produzione di un referto e con tutte le necessarie comunicazioni orali relative ai risultati di "allarme" o ai valori panico).

In questa fase, gli errori più comuni, responsabili del 18.4-47% degli errori totali del laboratorio, sono:

- ❖ validazione non corretta
- ❖ ritardo nella consegna dei risultati
- ❖ risultati non refertati o non refertati al richiedente corretto
- ❖ risultati refertati in maniera non corretta a causa di errori nell'inserimento dei dati
- ❖ errori di trascrizione post-analitici

Fasi di un test

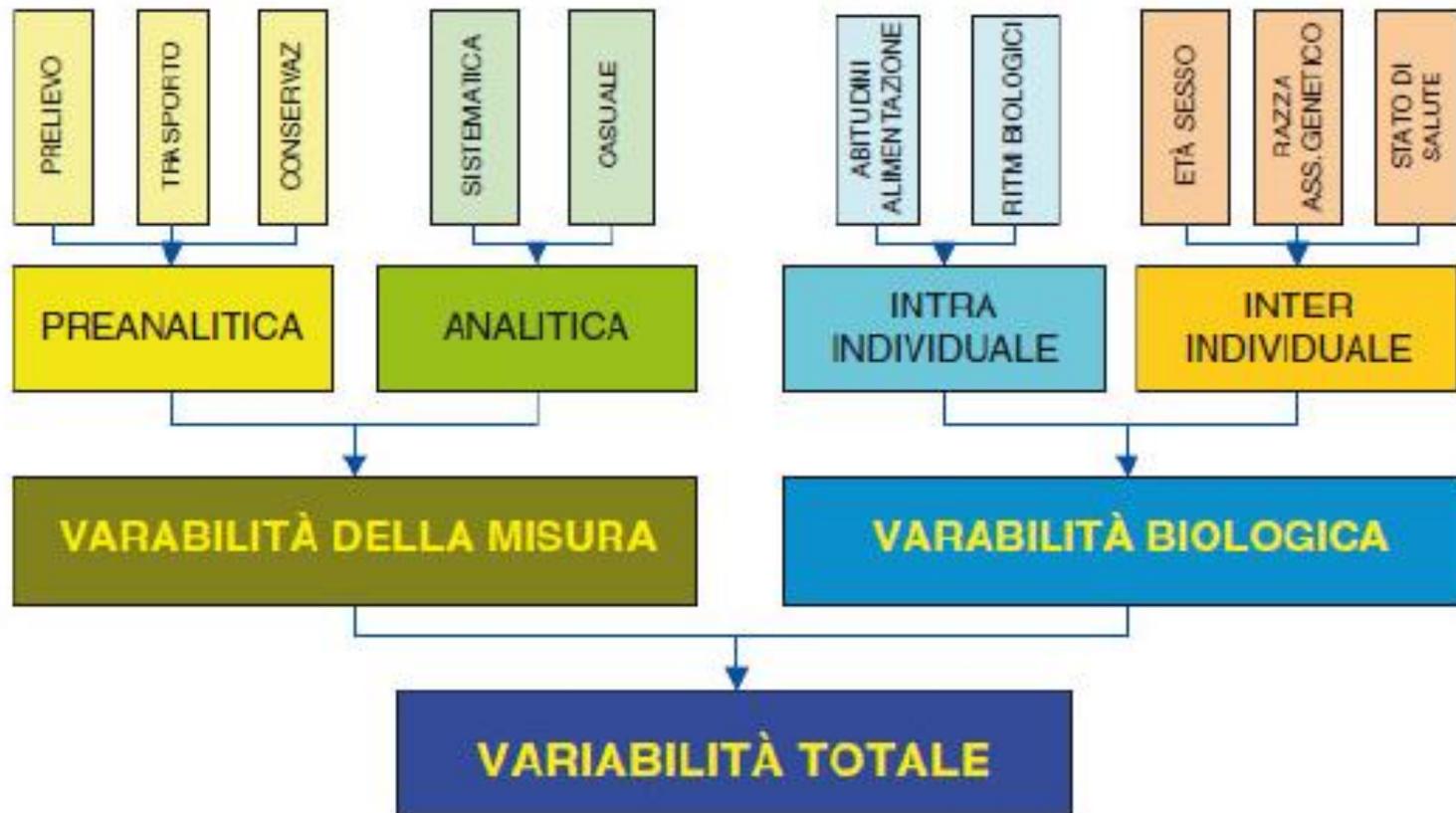
● Fase analitica

- Esecuzione delle analisi.
- Misura e calcolo dei risultati

Produce meno errori, è più controllata, è Standardizzata e quindi meno variabile.

● Fase post-analitica

- Validazione dei risultati
- Analisi della loro coerenza
- Presentazione in una forma tale (refertazione) da permettere l'interpretazione
- Invio al paziente o al medico curante.



Le varie componenti della variabilità osservate in Medicina di Laboratorio.

Errori analitici

