

Corso di laurea in Infermieristica (0530)

Insegnamento: Scienze Biochimiche e biologiche



Modulo: Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica



CAMPIONI BIOLOGICI

AVVERTENZA SULL'USO DEL MATERIALE DIDATTICO FORNITO AGLI STUDENTI

L'uso del materiale didattico fornito agli studenti deve essere considerato strettamente personale e la sua distribuzione deve essere in ogni caso autorizzata dal docente

- Il **sangue** è il fluido biologico prelevato più di frequente per le analisi cliniche di laboratorio.
- Viene in genere prelevato da una vena (nel braccio) direttamente in una provetta sottovuoto.
- In genere una **provetta** può contenere circa 5 ml di sangue, quantità sufficiente per eseguire molte analisi di chimica clinica, dal momento che gli analizzatori automatizzati richiedono campioni molto ridotti (di norma tra i 2 e i 100 μ l) per una singola analisi.
- In alcuni casi, quando il prelievo di sangue da una vena è particolarmente difficile, è possibile prelevare un campione di **sangue capillare** mediante una puntura cutanea e la raccolta di alcune gocce di sangue dal sito della puntura.
- Un tipico esempio è l'uso del sangue ottenuto con il prelievo dal **tallone dei neonati**.

- Altri **fluidi biologici** (matrici) spesso utilizzati per le analisi sono l'urina, la saliva, il liquido cerebrospinale (CSF), il liquido amniotico, il liquido sinoviale, il liquido pleurico, il liquido peritoneale e il liquido pericardico.
- Tali fluidi contengono spesso gli **stessi analiti biologici** di interesse, ad esempio glucosio e proteine, ma differiscono per proprietà chimiche e fisiche.
- Le **differenze** nelle caratteristiche dei fluidi vengono definite differenze delle matrici.
- I metodi di analisi progettati per determinare un analita nel plasma sanguigno **non è idoneo** per la determinazione del medesimo analita negli altri fluidi (matrici).
- Quando si utilizza un metodo per l'analisi di un fluido diverso dal plasma sanguigno o dal siero, è importante **verificare** che il metodo sia idoneo per il tipo di campione di fluido disponibile.

FLUIDI COMUNEMENTE UTILIZZATI PER LE ANALISI DI CHIMICA CLINICA

Sangue (sangue intero, siero o plasma)

Urina

Liquido cerebrospinale (CSF)

Liquido amniotico

Saliva

Liquido sinoviale (liquido che si trova nelle cavità delle giunture)

Liquido pleurico (prelevato dal sacco che circonda i polmoni)

Liquido pericardico (prelevato dal sacco che circonda il cuore)

Liquido peritoneale (denominato anche liquido ascitico; dall'addome)

SANGUE



- Il sangue è il campione che si utilizza più spesso per le analisi del laboratorio clinico.
- Il sangue è costituito da **due parti principali**: una porzione liquida (detta **plasma**, che contiene ioni e molecole disciolte) e una porzione **cellulare** (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine).
- La maggior parte degli analiti di chimica clinica si trovano nel **plasma**.
- Parte della preparazione del sangue per la valutazione di tali analiti consiste nella **rimozione** delle cellule.
- Questa operazione si esegue mediante **centrifugazione** del campione, che consente di isolare le cellule sul fondo della provetta del prelievo e rimuovere la porzione liquida da analizzare.

- Se un campione di sangue viene prelevato in una provetta che contiene un additivo che ne impedisce la coagulazione (**definito anticoagulante**), la porzione liquida del sangue viene chiamata **plasma**.
- Se il sangue viene raccolto in una provetta **priva** di anticoagulante, il sangue formerà un **coagulo**.
- Un coagulo è un composto semisolido gelatinoso di proteine legate che si forma in un processo a più fasi che si definisce cascata coagulativa.
- Durante la centrifugazione, il coagulo scende verso il fondo della provetta insieme alle cellule.
- Il liquido sovrastante che ne risulta viene chiamato **siero**.
- Il siero contiene tutti i componenti del plasma, fatta **eccezione** per le proteine della coagulazione, che vengono consumate nella cascata di reazioni che danno origine al coagulo di sangue.

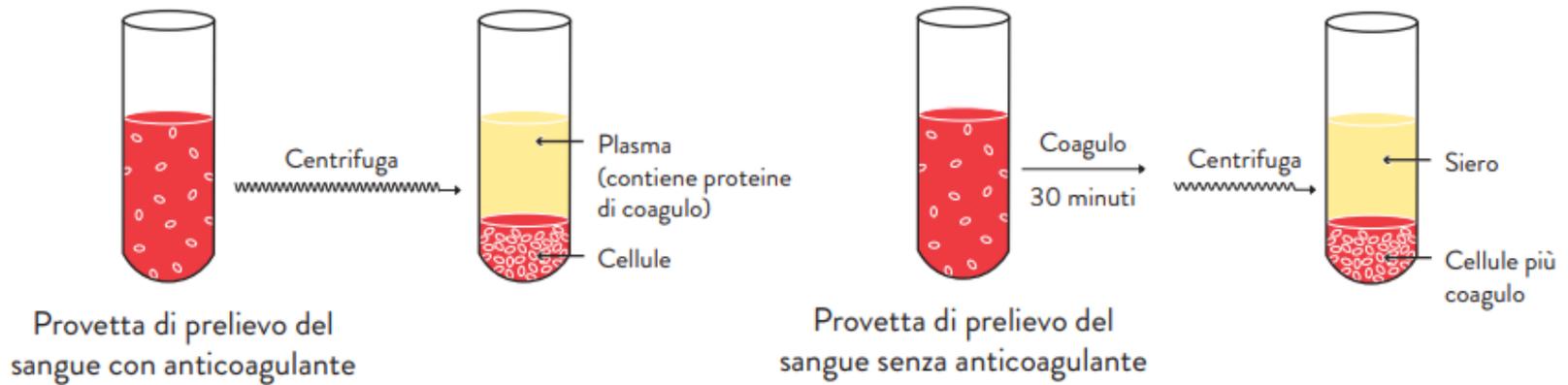


Figura 1-1: Preparazione di siero e plasma.

- Alcune analisi di chimica clinica si eseguono meglio sul plasma, altre sul siero e altre ancora si possono eseguire indifferentemente su plasma o siero.

Le provette utilizzate per il prelievo di sangue sono dotate di colori differenziati secondo un codice che segnalano quali additivi, se presenti, sono contenuti nella singola provetta.

Gli additivi possono essere anticoagulanti che consentono di preparare il plasma o delle sostanze che proteggono gli analiti dalla degradazione chimica o metabolica.

Nota: alcuni tipi di anticoagulanti possono non essere compatibili con alcuni tipi di analisi. Ad esempio, l'**EDTA** è un **anticoagulante** che impedisce la coagulazione del sangue sequestrando gli ioni di calcio necessari per le reazioni di coagulo. I campioni di plasma prelevati utilizzando provette con EDTA sono quindi in genere **non idonei** per la misurazione del **calcio** e per tutti i metodi di analisi che prevedono una fase di **reazione** che dipende dalla disponibilità del calcio.

TIPI DI PROVETTE PER IL PRELIEVO DI SANGUE COMUNEMENTE UTILIZZATE PER LE ANALISI DI

ADDITIVO NELLA PROVETTA**	COLORE DEL TAPPO	CAMPIONE	COMMENTO
Nessuno	Rosso	Siero	Il coagulo richiede almeno 30 minuti a temperatura ambiente
Attivatore coagulo silicone	Rosso/nero	Siero	Il silicone velocizza il processo di coagulo rispetto all'assenza di attivatori
Trombina	Grigio/giallo	Siero	Velocizza il processo di coagulo in modo significativo al fine di produrre siero in pochi minuti: si utilizza in genere per le analisi urgenti (STAT)
Eparina di litio	Verde	Plasma	Campione di plasma preferito per la maggior parte delle analisi chimiche, non idoneo per l'analisi del litio
Eparina di sodio	Verde	Plasma	Si utilizza per l'analisi del litio, non idoneo per l'analisi del sodio
EDTA (acido etilendiamminotetraacetico come sale di sodio o potassio)	Lavanda	Plasma	Si utilizza in alcuni casi per delle analisi chimiche e di norma in ambito ematologico
EDTA di potassio in provetta in plastica speciale	Beige o marrone	Plasma	Si utilizza per l'analisi del piombo nel sangue; le provette sono certificate per un contenuto estremamente basso di piombo
Fluoruro di sodio/ossalato di potassio	Grigio	Plasma	Si utilizza per le analisi del glucosio. Il fluoruro di sodio inibisce il metabolismo del glucosio da parte dei globuli bianchi

*Per ulteriori informazioni visitare il sito web www.bd.com/vacutainer

**Alcune provette di prelievo contengono anche un gel di silicone inerte che si frappono tra le cellule e il siero o plasma durante la centrifugazione. Il gel sigilla le cellule sul fondo della provetta e impedisce alle sostanze chimiche di diffondersi. Sono disponibili anche provette con un gel di separazione del siero (contrassegnate con SST) o di separazione del plasma (contrassegnate con PST).

Prelievo di sangue

Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

- Prima di effettuare qualsiasi prelievo del sangue è importante porre attenzione ad alcune piccole ma importanti regole affinché l'analisi del sangue sia il più possibile corretta.

► Fattori come

1. il digiuno
2. la dieta
3. l'assunzione di farmaci
4. l'esercizio fisico
5. la postura del fisico

possono in misura diversa influenzare la buona riuscita dell'analisi.

Si rende opportuno quindi convalidare alcuni semplici consigli per semplificare e facilitare l'operazione del prelievo e delle analisi.



1. DIGIUNO



Vi è accordo unanime sull'opportunità che il paziente si presenti al prelievo a digiuno da almeno **8 – 12 ore**.

In questo periodo possono essere assunte solo **modiche quantità di acqua** e devono essere assolutamente **escluse bevande zuccherate, alcolici, caffè, fumo.**

Queste sostanze infatti possono rendere inaccurate o addirittura impossibile le quasi totalità delle determinazioni ematochimiche.

2. DIETA

- ❖ Nei giorni che precedono il prelievo la dieta dovrebbe essere quanto più possibile **abituale**, evitando brusche variazioni dell'apporto calorico sia in eccesso che in difetto.
- ❖ Con una riduzione drastica dell'apporto calorico (300/600 calorie/die), infatti, si è riscontrata una **diminuzione del volume plasmatico del 30%**.
- ❖ Questa riduzione induce rapidi cambiamenti nel sangue che le analisi rivelano.
- ❖ La dieta deve essere abituale anche **qualitativamente** → un apporto di carboidrati, proteine e grassi che segua la normale dieta personale.

3. FARMACI



- ✓ Esistono numerosi studi riguardanti l'effetto dei farmaci sui test di laboratorio.
- ✓ Le interferenze possono manifestarsi **direttamente o indirettamente** a livello analitico.
- ✓ Nel primo caso esse **non** sono sempre e completamente prevedibili nella loro entità per un'ampia serie di variabili individuali che determinano l'assorbimento, il metabolismo e l'eliminazione del farmaco.
- ❖ Non di tutti i farmaci in commercio sono sufficientemente noti gli **effetti collaterali**, né vengono analizzate ed indicate le eventuali interferenze a livello analitico.
- ❖ La più corretta preparazione del paziente agli esami ematochimici dovrebbe prevedere la **mancaza assoluta** e più prolungata possibile di qualsiasi trattamento farmacologico.

4. ESERCIZIO FISICO



- Le variazioni delle attività enzimatiche e di alcuni analiti provenienti dalla **muscolatura scheletrica** in seguito all'esercizio fisico intensivo e protratto sono fenomeni attesi ed in genere da evitarsi immediatamente prima del prelievo o nelle 8 - 12 ore che lo precedono.

5. POSTURA

Nel passaggio dalla posizione supina a quella eretta si modificano il volume plasmatico, la concentrazione degli elementi figurati del sangue e di alcuni analiti, come il calcio, il magnesio, il fosforo, la bilirubina, le proteine totali, il ferro, i trigliceridi, il colesterolo, l'LDL e le transaminasi.



- La **preparazione del paziente prima del prelievo deve essere** quanto più possibile **standardizzata**
- Rendere possibile il corretto confronto fra i dati relativi di un paziente ricoverato (verosimilmente ottenuti da prelievi in posizione supina) e quelli relativi allo stesso paziente, ma ambulatoriale, con prelievi eseguiti "a sedere".
- Come raccomandazione la posizione **"a sedere"** per almeno 15 minuti prima di effettuare i prelievi sia nei pazienti ambulatoriali che nei pazienti ospedalizzati, **quando possibile**.



Errori durante il prelievo



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

La preparazione del paziente

- Il medico di base deve **dare risalto all'importanza** del comportamento del paziente prima di un prelievo di sangue.
- I **pazienti non sempre** sono a conoscenza dell'influenza che possono avere i propri comportamenti (es. dieta, stimolanti, attività fisica...) sui parametri che si andranno ad analizzare.
- Utile chiedere al paziente, prima di effettuare il prelievo, se ha tenuto un comportamento inadatto, in questo caso il prelievo di sangue può essere rinviato ad **un altro giorno**.
- **Ridurre l'ansia** del paziente, uno dei fattori generali di **vasocostrizione**.
- Un'atmosfera **calma** è il requisito più importante per realizzare un buon prelievo. **Un'atmosfera frenetica**, così come una stanza **fredda** o mani troppo fredde del personale che effettua il prelievo, possono condurre a **vasocostrizione**.
- Considerare le **richieste del paziente** come ad es: il luogo di puntura, la posizione del corpo e cercare di soddisfarle se possibile.

L'orario del prelievo



- L'influenza delle fluttuazioni dei parametri causate dal **bioritmo** della persona possono essere minimizzate se il prelievo di sangue viene effettuato tra le 7 e le 9 del mattino.

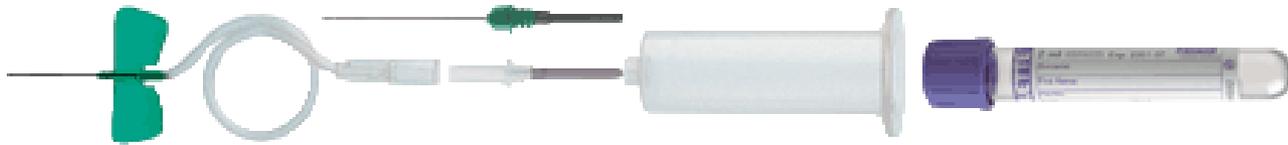
Il prelievo di sangue

- Indossare sempre i **guanti** e gli **occhiali protettivi** durante il prelievo e quando si maneggiano le provette per minimizzare i rischi d'infezione.
- Scegliere la **provetta** o le provette adatte per l'esame richiesto.
- Togliere la parte grigia del tappo di protezione dell'ago.



Il prelievo di sangue

- Avvitare **l'ago nella camicia**. Assicurarsi che l'ago sia fermo e che non si possa muovere durante l'uso.
- Applicare il **laccio emostatico**, preferibilmente monouso, quattro dita (7,5 cm circa) sopra il punto di prelievo designato.



- La durata dell'applicazione del laccio emostatico non dovrebbe eccedere 1 minuto; il rischio è che si falsifichino i risultati a causa di emoconzentrazione.



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica





Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Il prelievo di sangue



- **Disinfettare** attentamente e a lungo il sito di puntura.
- Per far sì che ci sia una riduzione batterica della flora della pelle occorrono 3 minuti con una soluzione a base d'alcool e 5 minuti con la soluzione a base d'iodio.
- Non palpare manualmente la vena dopo la pulizia!



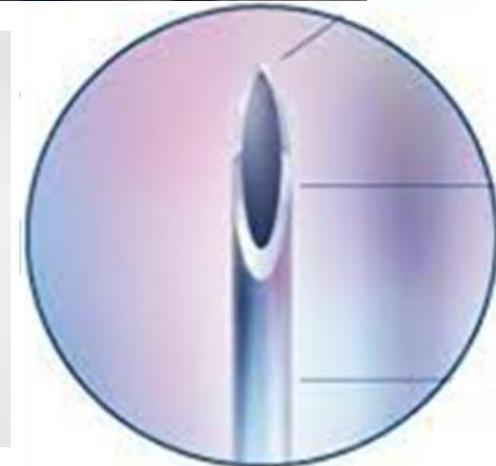
- Il braccio del paziente deve essere **disteso** in modo obliquo e rivolto verso il basso.
- **Togliere** il tappo di protezione dell'ago.
- Effettuare la puntura con l'ago a un angolo di 10° - 20° rispetto alla pelle ed in linea con la vena scelta.

Il prelievo di sangue

- Inserire l'ago 10-15 mm fino a che non raggiunga il lumen della vena.
- La mano che effettua la perforazione dovrebbe continuare a tenere il sistema di prelievo.
- Sono da evitare cambiamenti di mano che non siano necessari.

Sicuro trasferimento del sangue dalla siringa alla provetta sottovuoto:

- aiuta a ridurre i rischi d'infezione da puntura accidentale
- questo dispositivo risponde a tutti i requisiti di sicurezza e di procedura per il trasferimento del sangue;
- prodotto sterile confezionato singolarmente (monouso)
- riduce l'effetto d'emolisi dovuto alla forte pressione durante il trasferimento di sangue dalla siringa alla provetta.



Il prelievo di sangue

- Usare la mano libera per inserire la provetta sottovuoto nella camicia.
- Spingere la provetta nella camicia finché l'ago penetri la parte di gomma del tappo.
- Assicurarasi di penetrare il tappo di gomma della provetta al centro per evitare la fuoriuscita di sangue e una precoce perdita di vuoto.
 - **Allentare** il laccio emostatico nel momento in cui si vede del sangue nella provetta.
- Il campione di sangue non dovrebbe venire a contatto con il tappo di gomma della provetta durante il prelievo.

Il prelievo di sangue

- **Nota:** tenere la provetta sempre stretta sulla camicia premendola con il pollice per accertare il tiraggio completo di vuoto.
- Quando la prima provetta è piena e il flusso di sangue cessa rimuoverla delicatamente dal holder.
- Inserire successivamente le altre provette nella **camicia**.

DURATA E INTENSITÀ DELLA STASI

- Il laccio emostatico viene utilizzato per trovare più **facilmente la vena** e rende più facile il prelievo di sangue.
- Ciò genera una pressione nella vena che provoca emoconcentrazione.
- Il cambiamento nella concentrazione dipende dalla lunghezza e dalla intensità della stasi.
- Una stasi fino a **60 secondi** è accettabile e non ha effetti significativi sul campione di sangue.

DURATA E INTENSITÀ DELLA STASI

- La **pressione** del laccio emostatico, preferibilmente monouso e latex free, dovrebbe essere sempre minore della pressione sistolica affinché sia limitata la perdita del fluido nella vena congestionata.

DURATA E INTENSITÀ DELLA STASI

- Il laccio emostatico non deve essere applicato troppo stretto: dovrebbe essere possibile sentire **il pulsare della vena**.
- Se il laccio emostatico rimane applicato per tutta la durata del prelievo si può avere l'emolisi.

Tecniche per l'individuazione della vena

- Ci sono varie tecniche per localizzare la vena, quella più spesso utilizzata ha un effetto sulla qualità del campione e quindi dovrebbe essere evitata; è la cosiddetta **tecnica "pump"**: si fa pompare il sangue del paziente facendogli aprire e chiudere il pugno.
- Questa tecnica può causare un aumento considerevole di potassio.
- Un' altra tecnica da evitare è quella di battere ripetutamente il dito sul luogo di puntura: può condurre a una distorsione del campione.

Tecniche per l'individuazione della vena

- **Tecnica corretta per localizzare la vena del paziente:**
 - **1- Inclinare il braccio del paziente verso il basso;**
 - **2- Far chiudere e aprire il pugno al paziente (senza pompare)**
 - **3- Toccare leggermente la vena scelta**
 - **4- Scaldare la zona dove si desidera effettuare il prelievo**
 - **5- Disinfettare la zona dove si vuole effettuare il prelievo**

Disinfettare il luogo di puntura

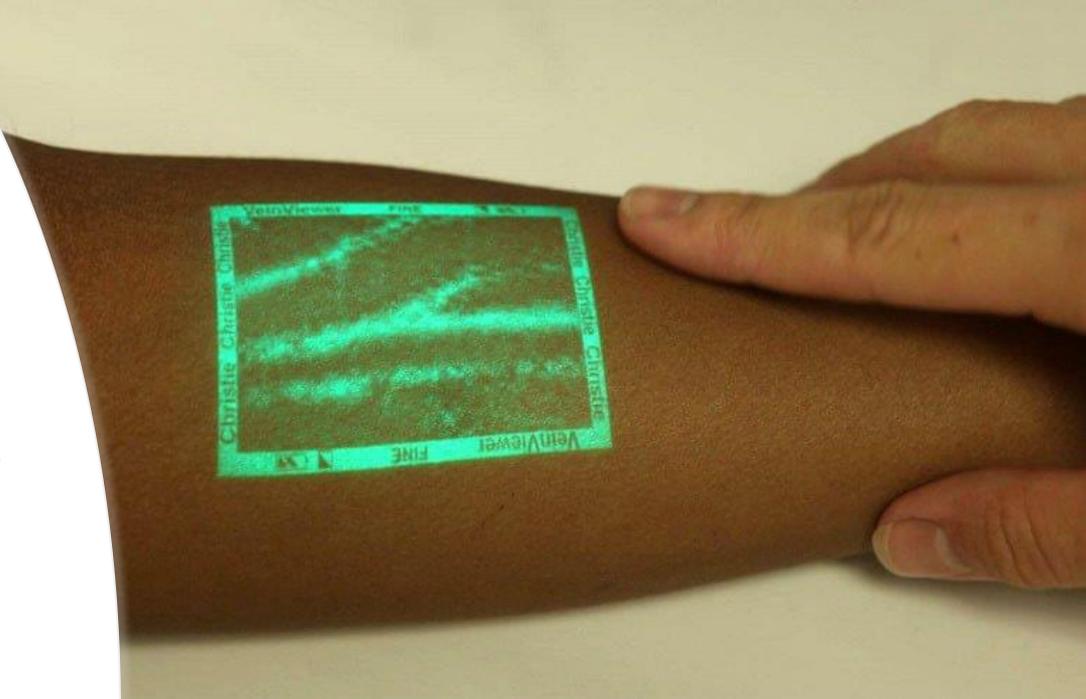
- Se la **disinfezione** è effettuata in modo **errato**, parte del disinfettante può entrare in contatto con il sangue e influenzare i risultati d'analisi.
- La soluzione disinfettante deve essersi asciugata completamente prima di effettuare il prelievo.

- Un apparecchio portatile che mostra le vene più nascoste dei pazienti e dei donatori di sangue rendendole immediatamente visibili sulla pelle facilitandone il prelievo.
- Questo è un progetto realizzato dagli scienziati della banca del sangue della Croce Rossa Australiana, ma che si sta diffondendo in diversi Paesi, che permette agli infermieri di individuare le vene prima dei prelievi, evitando quei tentativi che spesso scatenano l'ansia dei donatori e di coloro che si devono sottoporre agli esami del sangue.



Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

- Il dispositivo, tramite un sistema non invasivo a infrarossi, illuminerà le braccia del paziente, evidenziandone le vene, che appunto diventando facilmente visibili sulla pelle. La luce emessa dall'apparecchio viene assorbita dall'emoglobina, presente nei vasi sanguigni superficiali, e riflessa dai tessuti circostanti. I vasi superficiali si evidenziano quindi direttamente sulla cute del paziente, aparendo come immagini in negativo su fondo chiaro.



Il prelievo

- **Ripetuti tentativi di localizzare la vena durante il prelievo possono portare a contaminazione dovuta alla **tromboplastina** che può, per esempio, avere una considerevole influenza sulle determinazioni di coagulazione.**
- **Se necessario perforare l'altro braccio.**

Il prelievo da catetere



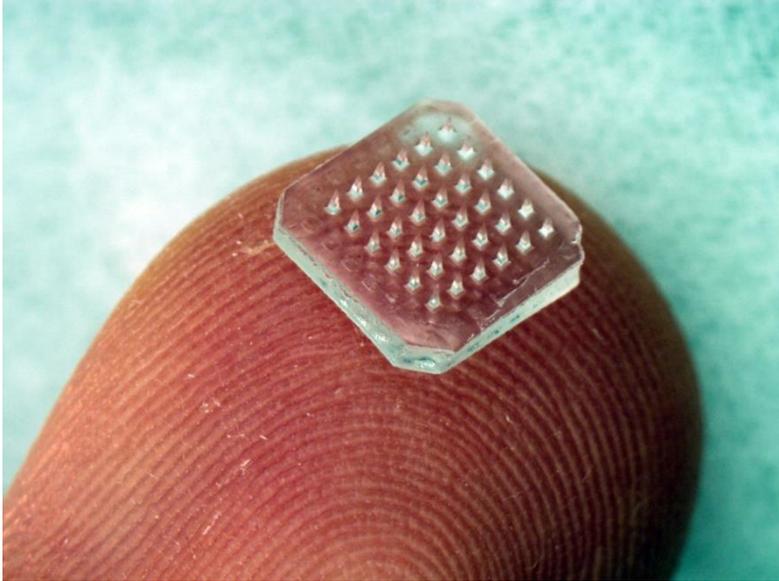
- Il prelievo da un catetere orizzontale è **sconsigliabile**; bisogna avere una grande attenzione per far sì di non contaminare il campione con la soluzione d'infusione.
- Se possibile evitare il prelievo da catetere.
- I primi 10 ml di sangue da catetere non devono essere usati come materiale per il campione di sangue e dovrebbero essere scartati.

HEMOLINK

THE OXYGEN THERAPEUTIC

- Preleva campioni di sangue senza aghi e in modo quasi indolore: è il dispositivo messo a punto da una startup dell'University of Wisconsin-Madison, negli Stati Uniti.
- Ha il diametro di una pallina da pingpong ed è composto interamente di plastica. Riesce a estrarre una quantità sufficiente di sangue per testare colesterolo, glicemia, infezioni e cellule tumorali, semplicemente premendolo per due minuti contro la pelle.





- **Grazie a una specie d'effetto sottovuoto e a principi di tecnologia microfluidica, il sangue fluisce direttamente nella provetta collegata, senza bisogno che chi lo adopera abbia alcuna formazione medica.**
- **Invece di perforare, estrae il sangue dai capillari.**
- **In due minuti il liquido si riversa in una provetta staccabile, che può essere inviata direttamente in laboratorio per le analisi**

Ordine di prelievo

- **Anche l'ordine di inserimento delle provette nell'Holder può condurre ad inquinamento del campione se non si segue una linea guida precisa.**
- **Le provette riempite di sangue possono lasciare sulla parte esterna della protezione dell'holder dei residui di additivi che potrebbero contaminare il campione.**

Ordine di prelievo

- **In genere è preferibile la seguente sequenza di provette:**

1° → Senza additivo

2° → Coagulazione - per gli esami di routine (PT e PPT) come prima provetta si potrà utilizzare anche una provetta di coagulazione

3° → Siero con o senza gel

4° → Eparina con o senza gel

5° → EDTA

6° → Glucosio

7° → Altri tipi di provette

Anticoagulante sbagliato

- Grazie al sistema di codificazione internazionale **ISO 6710** per le provette sottovuoto la confusione è generalmente evitata.
- Tuttavia la **disattenzione** o la **manca** di conoscenza possono condurre a una scelta errata della provetta da utilizzare.

Riempimento della provetta e miscelazione del sangue con l'additivo

- E' essenziale che le provette (soprattutto per le provette di coagulazione) siano riempite esattamente.
- Grazie alle provette **sotto vuoto** il corretto riempimento può essere subito verificato dall'operatore sanitario grazie alla linea di riempimento che permette il controllo visivo del volume di sangue.
- Le provette devono essere invertite per miscelare il sangue con l'additivo **SUBITO** dopo aver effettuato il prelievo.

Vacuum Blood Collection Tube

Name	Color	Additive	Material	Specifications	Volume
Plain Tube		No Additive	Glass	13*75/100mm	1 ~ 6ml
				16*100mm	5~10ml
			PET	13*75/100mm	1 ~ 6ml
				16*100mm	5~10ml
Serum Tube		Clot Activator	Glass	13*75/100mm	1 ~ 6ml
				16*100mm	5~10ml
			PET	13*75/100mm	1 ~ 6ml
				16*100mm	5~10ml
SSGT Tube		Gel&Clot Activator	Glass	13*75/100mm	1 ~ 6ml
				16*100mm	5~10ml
			PET	13*75/100mm	1 ~ 5ml
				16*100mm	5~10ml
EDTA Tube		EDTA K2/EDTA K3	Glass	13*75/100mm	1 ~ 6ml
				16*100mm	5~10ml
			PET	13*75/100mm	1 ~ 6ml
				16*100mm	5~10ml
Heparin Tube		Sodium Heparin/ Lithium Heparin	Glass	13*75/100mm	2 ~ 6ml
				16*100mm	6~10ml
			PET	13*75/100mm	2 ~ 6ml
				16*100mm	6~10ml
Glucose Tube		Potassium Oxalate& Sodium Fluoride	Glass	13*75/100mm	2 ~ 6ml
			PET	13*75/100mm	2 ~ 5ml
ESR Tube		Sodium Citrate(1:4) 0.129mol/l (3.8%)	Glass	13*75/100mm 8*120mm	1 ~ 5ml 1.8ml
			PET	13*75/100mm	1 ~ 5ml
PT Tube		Sodium Citrate(1:9) 0.109mol/l (3.2%)	Glass	13*75/100mm	1 ~ 5 ml
			PET	13*75/100mm	1 ~ 5ml



TAPPO ROSSO/GIALLO – **NO** ANTICOAGULANTE



- **Esami sierologici.**
- Contengono al loro interno **microparticelle** di silice che attivano la coagulazione nel momento in cui la provetta viene invertita, dopo il prelievo.

Dosare numerosi analiti:

- enzimi epatici
- ormoni tiroidei
- titolo anticorpale.

Non può essere utilizzato per i test di coagulazione, dal momento che il sangue ha già formato un coagulo e quindi i fattori di coagulazione sono già stati "consumati".

TAPPO VIOLA - EDTA (acido etilendiaminotetracetico):



- **L'EDTA** è in grado di sequestrare gli ioni Calcio, formando con esso dei sali insolubili: l'impossibilità di utilizzare gli ioni Calcio **blocca la cascata coagulativa**.
- Usata direttamente sugli analizzatori automatici per eseguire l'esame emocromocitometrico.
- L'EDTA infatti **non altera** la morfologia delle cellule del sangue ed entro 3 ore dal prelievo si può usare il campione anche per effettuare degli strisci di sangue da osservare al microscopio ottico.



TAPPO AZZURRO - SODIO CITRATO:

- Anticoagulante, come l'EDTA, sequestra gli ioni Calcio
- Il sangue trattato con sodio citrato viene utilizzato per la determinazione :

VES

- Per lo studio dei fattori di coagulazione (fibrinogeno, PT, APTT)

determinazione della funzionalità piastrinica.

- E' anche l'anticoagulante che viene utilizzato per il sangue delle trasfusioni.

TAPPO GRIGIO FLUORURO di SODIO:



- Oltre a sequestrare gli ioni Calcio, è una sostanza che stabilizza la concentrazione di glucosio nel sangue, **inibendo la glicolisi.**
- Per questo motivo usato nel momento in cui è necessario determinare la glicemia sul campione.

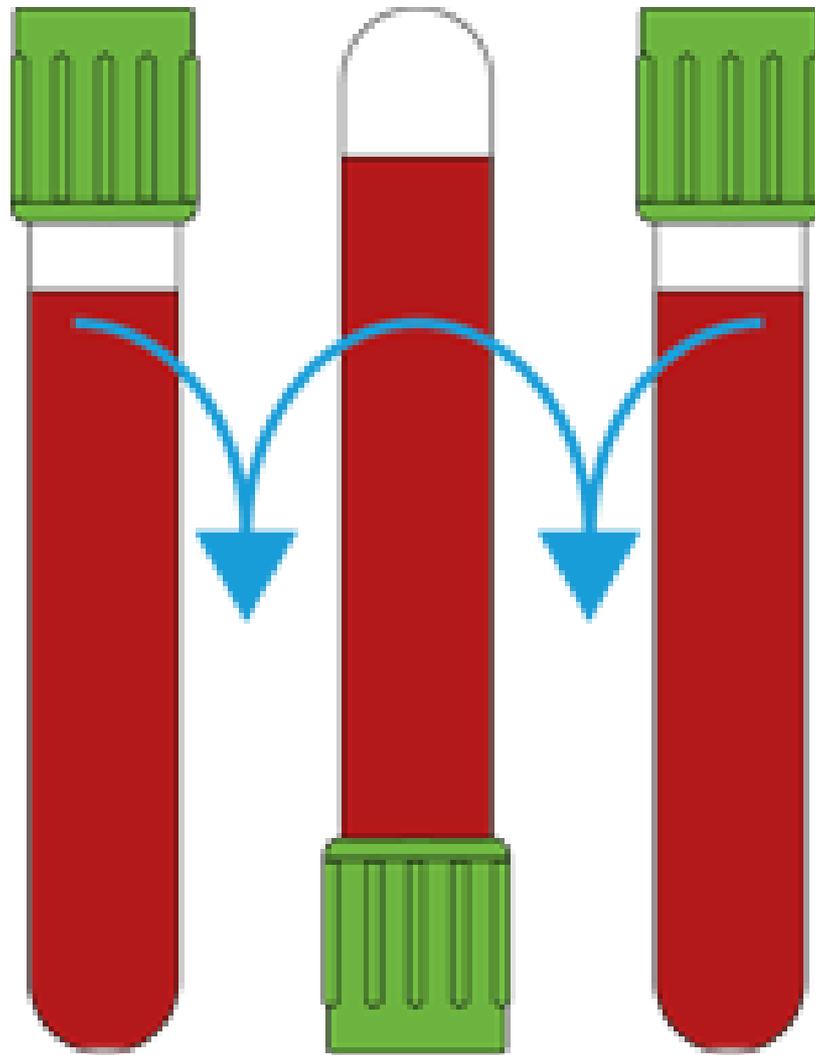
TAPPO VERDE - EPARINA



- Al contrario degli altri anticoagulanti, non agisce sugli ioni Calcio ma **impedisce** la formazione di trombina e fibrina.
- E' un anticoagulante “naturale” dal momento che è presente a bassi livelli sia nel sangue che nei tessuti.
- Utilizzata per le determinazioni plasmatiche nel laboratorio di biochimica clinica.
- **Non** può essere però usato per l'esame emocromocitometrico dal momento che **altera la morfologia** delle cellule del sangue e provoca aggregazione piastrinica.

Riempimento della provetta e miscelazione del sangue con l'additivo

- Nelle provette con anticoagulante la **miscelazione** inadeguata può provocare emolisi e/o portare a un risultato errato dell'analisi.
- **Le provette devono essere agitate DOLCEMENTE. NON SHAKERARE le provette! La miscelazione vigorosa può causare schiuma o emolisi!**



= 1 inversion

Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

Errori conservazione e trasporto campioni

Errori nella conservazione dei campioni biologici

- La durata di conservazione di un campione è limitata nel tempo.
- Molti campioni possono essere mantenuti alla temperatura ambiente per un lungo periodo mentre altri devono essere conservati nel frigorifero o essere congelati.
- Con alcune eccezioni, il siero o i campioni di plasma devono essere conservati in frigorifero a 4°C dopo la separazione delle cellule.

Errori nella conservazione dei campioni biologici

- Per uno stoccaggio a lungo termine sono necessarie temperature minori di -20°C .
- Un **congelamento veloce** è importante per mantenere la struttura delle proteine.
- Il processo di **scongelo** deve essere lento, durante la notte nel frigorifero o in bagno d'acqua e con una miscelazione continua.
- Assicurarsi che le provette siano **chiuse** saldamente durante lo stoccaggio altrimenti si potrebbero verificare delle evaporazioni che cambierebbero la concentrazione del sangue con l'additivo.
- Il siero o il plasma deve essere **separato immediatamente** dalle cellule dopo la centrifugazione.

Errori nel trasporto

- I campioni **DEVONO** essere protetti dalla luce durante il trasporto specialmente per la determinazione di parametri sensibili alla luce come la bilirubina.
- E' consigliabile trasportare le provette in posizione verticale.
- Le variazioni di temperatura durante il trasporto possono avere effetti negativi quindi si consiglia di portare subito i campioni in laboratorio.



Errori nel trasporto

- **Per quanto riguarda i campioni biologici essi devono essere trasportati con tre contenitori:**

1°- provetta sottovuoto Vacuette

2°-contenitore per le provette con spugna lavabile e coperchio SENZA maniglie

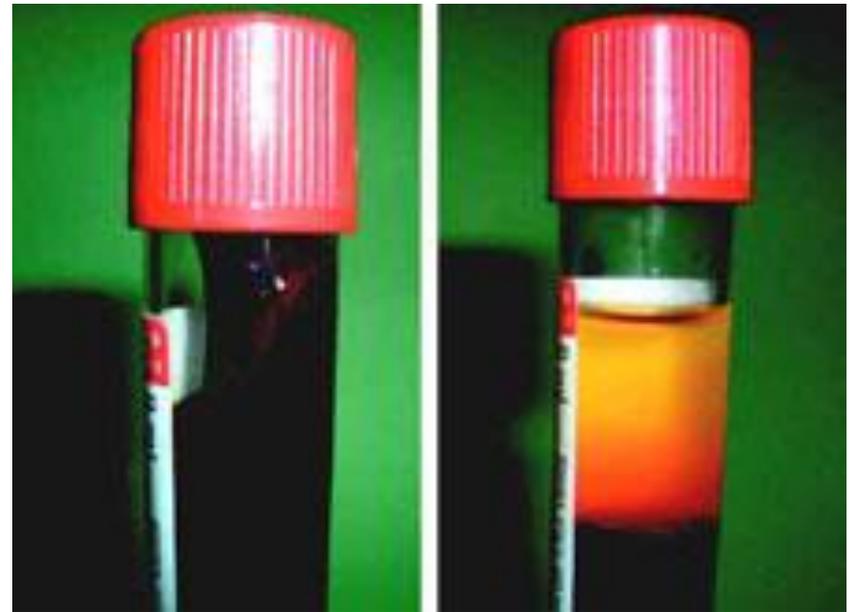
3°- borsa di trasporto con simbolo UN 3373 e scritta "materiale biologico"



Errori nella preparazione del campione

Errori nella centrifugazione

- La coagulazione del campione in provette tenute in posizione **dritta** dà una separazione migliore durante la centrifugazione, in particolare per le provette contenenti gel separatore.
- Nella foto sono comparate 2 provette: quella a sinistra è stata fatta coagulare in posizione orizzontale mentre quella di destra in posizione dritta.
- ***La differenza è macroscopica.***



Errori nella centrifugazione

- **Aspettare troppo tempo dopo il prelievo per centrifugare le provette può causare cambiamenti nel siero/plasma.**
- **Se il tempo d'attesa prima della centrifugazione è troppo breve e il sangue non ha potuto coagulare si può avere una post-coagulazione nel siero.**
- **Il risultato è la fibrina nel siero che può causare blocchi agli analizzatori automatici.**
- **In più nel caso di provette con gel il gel separatore potrebbe non essere in grado di formare una barriera sufficiente.**



Errori nella centrifugazione

- Ecco un esempio concreto delle differenze con incorrette centrifugazioni: da sinistra a destra gli effetti di un aumento di forza d'accelerazione.
- A destra il campione centrifugato correttamente.
- I campioni con gel centrifugati devono essere trasportati in posizione dritta.



Errori nella centrifugazione

- **Non è necessario aspettare a centrifugare per i campioni con il plasma.**
- **I campioni non devono essere centrifugati nei primi 30 minuti dopo il prelievo di sangue.**
- **Per i pazienti in terapia anticoagulante la coagulazione sarà ritardata.**
- **I loro campioni di sangue dovranno essere centrifugati solo quando il grumo di sangue si è completamente formato.**

Errori nella centrifugazione

- **Condizioni di temperatura estreme (caldo o freddo) nella centrifuga possono portare a emolisi.**
- **La temperatura all'interno della centrifuga deve rimanere tra i 22°C e i 20°C (raccomandazione CLSI).**
- **La centrifugazione di provette aperte conduce ad evaporazione del campione: di conseguenza accertarsi sempre che le provette siano saldamente chiuse.**

Campioni insufficientemente omogeneizzati

- Il campione deve essere **omogeneo** prima di essere inserito nell'analizzatore.
- **Per esempio** il campione con EDTA deve essere miscelato completamente prima di essere usato.
- Si consiglia di utilizzare miscelatori meccanici.
- Un particolare problema si ha con i tubi per **VES** che hanno un diametro molto piccolo e se il campione non è sufficientemente omogeneo si può avere un **aumento** dei tassi di sedimentazione

Analisi dell'urina

Biochimica clinica e Biologia molecolare clinica

TIPO DI CAMPIONE DI URINA	UTILIZZO
Campione prelevato al mattino appena svegli	Fornisce un campione di urina concentrato che contiene l'accumulo notturno dei metaboliti. Utile per il rilevamento di proteine o analiti insoliti.
Casuale	Campione comodo da prelevare in qualsiasi momento. Spesso utilizzato per le analisi di routine.
A tempo	Viene prelevata la produzione di urina di 2 - 6 ore per ottenere un campione rappresentativo; la durata del prelievo dipende dagli analiti.
24 ore	Viene prelevata l'intera produzione di urina in un periodo di 24 ore. Equivale al prelievo temporizzato, ma si utilizza per i metaboliti la cui velocità di escrezione può variare a seconda dell'ora del giorno e quando è necessario un prelievo di 24 ore perché il campione sia rappresentativo.

L'analisi dell'urina

Quando deve essere raccolto il campione d'urina?

Bisogna distinguere tra:

- **urina del mattino**
- **urina casuale**
- **urina delle 24 ore.**

URINA DEL MATTINO

- C'è un'ulteriore differenziazione da fare tra prima urina e successive urinazioni: la prima urina del mattino (prima minzione) è spesso acida e concentrata, ciò la rende adatta per la rilevazione dei batteri.
- La raccolta di campioni nelle successive urinazioni sono raccomandate per la determinazione di iperglicosuria e per l'esame del sedimento urinario.
- Consigli sulla raccolta delle successive urinazioni:
 - Accertarsi che il paziente sia a digiuno;
 - Accertarsi che il paziente non abbia svolto attività sportiva prima della raccolta d'urina.



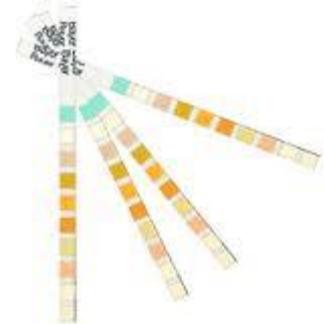
URINA CASUALE

- **L'urina casuale è raccolta in qualsiasi momento; questo è il campione più semplice da raccogliere ed è generalmente utile soltanto se i sintomi clinici suggeriscono un'analisi delle urine immediata e necessaria; per esempio se ci fosse un sospetto d'infezione dell'apparato urinario o un'intossicazione.**
- **Per le tipologie di urine casuale e prima urina è consigliabile raccogliere il campione scartando il primo e l'ultimo mitto (getto) d'urina così da evitare la contaminazione di batteri**

Tecniche per la raccolta dell'urina

- **RACCOLTA URINE 24 ORE**
- La raccolta d'urine di tutta una giornata bilancia le fluttuazioni che si sono verificate durante il giorno.
- Gli errori di raccolta che avvengono frequentemente possono essere minimizzati fornendo istruzioni precise ed esatte al paziente.
- Quando si raccolgono le urine delle 24 ore bisogna seguire i seguenti punti:





Analisi chimica dell'urina (strumentale e con dipstick)

- I **dipstick** o **multistick** per l'analisi dell'urina sono strisce di plastica cui sono attaccati una serie di tamponcini assorbenti impregnati chimicamente.
- Ciascun tamponcino contiene dei reattivi che reagiscono con una sostanza presente nell'urina, producendo un cambiamento di colore nel tamponcino.

Analisi chimica dell'urina (strumentale e con dipstick)

- Questo cambiamento di colore viene poi paragonato con una serie di **standard** noti in modo che la reazione osservata nel campione può essere valutata e quantizzata.
- Questa metodologia:
 - ❑ è semplice e facile da apprendere
 - ❑ è rapida e costituisce una procedura di analisi, che, sia pure con alcune limitazioni, fornisce una valutazione affidabile a costi contenuti di molti dei costituenti dell'urina.



Procedure per l'analisi chimica dell'urina con dipstick



mescolare il campione



immergere il dipstick

eliminare l'eccesso di urina



controllare il
tempo di reazione



valutare il risultato
per confronto con
una *color chart*





URS-11

Reagent Strips for Urinalysis

Anti-VC interference ability

APPLICATION:

For medical organization testing and analyzing the urine specimen

IMPORTANT:

Keep away from light and moisture.
Promptly replace cap after taking out strips.
Do not remove desiccants.
Do not touch test areas of reagent strips.
Use it within the expiration date.
Read insert carefully before use.

LOT



100 Strips

For Professional Use Only

TESTING AND READING TIME

Rev.07/2014

Leukocytes 120s	Neg.			Trace 15	Small 70	Moderate 125	Large 500	cells/ μ l
Nitrite 60s	Neg.				Positive Any degree of uniform pink color			
Urobilinogen 60s	3.2	Normal	16		32 +	64 ++	128 +++	μ mol/l
Protein 60s	Neg.		Trace ±	0.3 ±	1.0 ++	3.0 +++	≥20.0 ++++	g/l
pH 60s	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	
Blood 60s	Neg.	Non hemolyzed 10 Trace		Hemolyzed 10 Trace	25 Small	80 Moderate	200 Large	cells/ μ l
Specific Gravity 45s	1.000	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030	
Ascorbate 40s	0			0.6	1.4	2.8	5.0	mmol/l
Ketone 40s	Neg.		Trace 0.5	Small 1.5	Moderate 4.0	8.0	Large 16	mmol/l
Bilirubin 30s	Neg.				Small 17	Moderate 80	Large 100	μ mol/l
Glucose 30s	Neg.		5 Trace	15 +	30 ++	60 +++	110 ++++	mmol/l

+30°C



IVD

