

La preanalitica: un fattore chiave per una diagnosi di successo

Dott.ssa Jennifer von Luckner

Come fare diagnosi senza test di laboratorio? Che si tratti di emocromo, rilevamento di agenti patogeni o patologia, è difficile immaginare una diagnostica di successo senza test di laboratorio. Ciò che spesso non viene considerato è quanto sia importante ciò che accade al campione prima che arrivi in laboratorio. Vogliamo sfruttare al meglio i tuoi campioni. Aiutaci a farlo!

LE BASI

La storia clinica ci aiuta ad aiutarti.

I tuoi sospetti sono particolarmente importanti, in particolare in presenza di strisci di sangue, citologia, istopatologia e rilevamento di agenti patogeni mediante coltura. Più sappiamo del paziente e del problema, più precisamente possiamo cercare eventuali alterazioni e interpretarne i risultati.

Il plasma può essere ottenuto dal sangue di citrato, EDTA ed eparina. Urina, plasma/siero e liquido cerebrospinale sembrano molto simili. Una corretta etichettatura aiuta a evitare errori.

In un moderno laboratorio molti processi sono automatizzati.

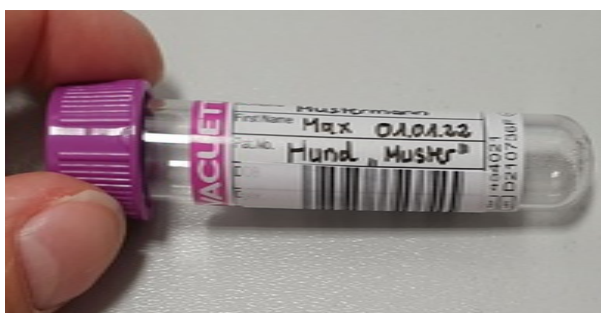
I codici a barre attaccati in modo errato o mancanti sulle provette comportano tempi e sforzi aggiuntivi. Ciò richiede tempo prezioso nel processo diagnostico.

La modalità di identificazione del campione può essere cruciale per l'analisi e può avere conseguenze per i colleghi di laboratorio.

Dovresti evitare quanto segue: chiudere siringhe con cannule invece di tappi appropriati, campioni patologici in contenitori di vetro e campioni fecali in guanti. Esiste il rischio di lesioni, contaminazione del campione e perdita del campione.



Codici a barre **erroneamente** attaccati



Codice a barre **correttamente** attaccati

Immagine: Laboklin

Valori di laboratorio accurati si ottengono dal giusto materiale.

Se un parametro viene determinato dal materiale sbagliato, può diventare inutile per la diagnosi. Il materiale di cui hai bisogno è indicato nel modulo di richiesta esami. Indicaci il tipo di campione inviato.

Il trasporto tramite corriere è consentito solo per campioni correttamente imballati ed etichettati.

Utilizza i materiali di imballaggio forniti (costituiti da provetta campione primaria, porta provetta/contenitore di trasporto secondario, imballaggio esterno). Per i campioni liquidi, deve esserci del materiale assorbente tra la provetta/contenitore primario e secondario e le provette devono essere protette contro la rottura. Per l'invio di campioni in Germania per via aerea, è assolutamente necessario che questi siano imballati e contrassegnati secondo le normative UE: tutte le provette devono essere imballate in un secondo contenitore protettivo a prova di perdita e poi in scatola di cartone rigido con materiale di imbottitura. La scatola di cartone deve essere contrassegnata con l'etichetta **"UN3373 Sostanza biologica Categoria B"**.

Puoi trovare maggiori dettagli nel PDF "Directory of Tests" di Laboklin.

ANALISI DEL SANGUE

Il livello di riempimento dei tubi ha un'influenza significativa sui parametri misurati!

Se c'è troppo poco sangue in una provetta, c'è un eccesso di anticoagulante. Ciò, tra l'altro, influenzerà la morfologia cellulare e porterà a valori di coagulazione non correttamente prolungati. Anche il riempimento eccessivo causa problemi (ad es. coagulazione dei campioni di plasma).



Il volume di riempimento ideale varia da un tubo all'altro (vedere le frecce sui due tubi a destra per la tacca del livello di riempimento che deve essere rispettato).

Immagine: Laboklin

L'ordine delle provette durante la raccolta del sangue può avere enormi conseguenze.

Le provette EDTA devono essere riempite per ultime. Anche la minima contaminazione dell'ago con EDTA può portare a errori significativi durante la misurazione di calcio e potassio. Se è necessaria la coagulazione del sangue, le prime gocce di sangue devono essere eliminate o deve essere riempita prima un'altra provetta.

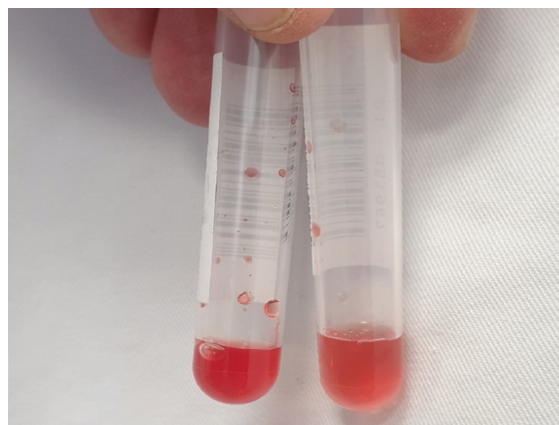
Il tipo di provetta influisce sul flusso di lavoro del laboratorio.

Le provette piccole con tappi a vite sono popolari ma danno problemi. Innanzitutto i coperchi spesso non ne permettono la chiusura completa così da rischiare una perdita di campione. Inoltre, gli aghi degli analizzatori non possono forarli. I campioni devono essere pipettati a mano. Ciò provoca ritardi nel flusso di lavoro.

La condizione del campione determina quanto sarà utile la diagnosi.

Idealmente, il campione viene raffreddato e protetto dalla luce fino alla spedizione. Dovrebbe essere posta la massima attenzione già a partire dalla struttura veterinaria per quanto riguarda la corretta conservazione del materiale del campione. Un campione di sangue rimasto in giro tutto il giorno a temperatura ambiente in piena luce diurna produrrà risultati errati di alcuni parametri (ad es. bilirubina). L'errore è nel dettaglio!

La centrifugazione e il pipettaggio sono noiosi ma necessari!



Un campione che non è stato centrifugato diventerà quasi sempre emolitico

Immagine: Labklin

Quando viene prelevato sangue intero, si verificheranno emolisi e il metabolismo cellulare. Ciò porta a misurazioni errate e possibili conseguenze possono essere di vasta portata per le decisioni cliniche. Posiziona il campione in posizione verticale (non in posizione sdraiata in questo momento!) e separa il siero/plasma il prima possibile dopo la raccolta (prima lascia coagulare il siero a temperatura ambiente). Assicurati di pipettare anche il surnatante per la spedizione. La semplice centrifugazione senza trasferire il surnatante è inutile!

Uno striscio di sangue fa parte di un esame emocromocitometrico.

Anche il breve tempo di trasporto porta a cambiamenti fondamentali nelle cellule. Se prepari già uno striscio presso la tua struttura, fissi le celle intatte sul vetrino e ci dai così l'opportunità di fare una buona valutazione.

BIOLOGIA MOLECOLARE – PCR per patogeni

Il DNA del patogeno viene moltiplicato con una reazione a catena della polimerasi (PCR) e rilevato con metodi ottici. Questo è un metodo diretto di rilevamento degli agenti patogeni. Tuttavia, viene rilevato anche il DNA di agenti patogeni morti. Attenzione: un risultato negativo non esclude un'infezione.

Il momento in cui viene prelevato il campione può essere determinante.

È molto più probabile che l'agente patogeno venga rilevato nel sangue durante la viremia, la batteriemia e la parassitemia o durante la febbre. Se i patogeni vengono escreti in modo intermittente nelle feci (ad es. *Tritrichomonas foetus*) sarà necessario inviare un campione fecale prelevato per 3 giorni consecutivi.

È necessario considerare il materiale e la gestione del campione.

Per la PCR, il **sangue EDTA** è un materiale adatto per il rilevamento di agenti patogeni del sangue. Il litio eparina è un inibitore della PCR e quindi solo di limitata idoneità. Per gli agenti patogeni che vengono escreti attraverso le mucose (ad es. nelle malattie respiratorie), utilizzare **tamponi sterili senza mezzo di trasporto**. Il terreno di trasporto può disturbare la PCR.

I **campioni fecali** dovrebbero avere le dimensioni di una nocciola. Il rilevamento del coronavirus equino ha senso solo dalle feci (i tamponi mucosali non sono adatti). Le feci contengono inibitori naturali della PCR (es. acidi biliari). Se si verifica l'inibizione, ripeteremo il test con un campione diluito. Questo diluisce anche l'agente patogeno e purtroppo aumenta la probabilità di risultati falsi negativi.

A seconda del sospetto diagnostico e dei sintomi, potrebbero essere indicati anche **altri campioni** (ad es. biopsie cutanee, linfonodi, urine). Questi campioni vengono inviati in contenitori sterili e vuoti. La soluzione fissativa può distruggere il DNA e causare esiti falsi negativi. I campioni non devono essere inviati refrigerati ma devono essere conservati in frigorifero fino alla spedizione. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti.

Tieni presente che non è possibile eseguire un antibiogramma dopo aver eseguito una PCR!

MICROBIOLOGIA – Coltura di patogeni

Prelievo del campione – a cosa prestare attenzione:

non disinfettare il sito del prelievo prima di prelevare il campione; rimuovere preventivamente le secrezioni e gli strati superficiali solo con un tampone sterile. Assicurati di prelevare quanto più materiale possibile ed evita la contaminazione con la flora fisiologica dell'ambiente sano circostante.

Il momento giusto

Per individuare agenti patogeni in grado di moltiplicarsi, il prelievo deve essere effettuato il prima possibile dopo l'insorgenza dei segni clinici e sicuramente prima dell'inizio del trattamento antibiotico. Se è stato effettuato il pretrattamento, si raccomanda di prelevare il campione attendendo una settimana dopo l'interruzione della somministrazione dell'antibiotico. Se il trattamento non ha successo o se il paziente peggiora durante il trattamento, la diagnostica può essere avviata anche durante il trattamento antibiotico. Tuttavia, l'effetto del trattamento antibiotico potrebbe inibire la crescita in vitro dell'agente patogeno anche se i batteri vitali sono ancora presenti in vivo.

Il sito giusto

Quando si decide il sito del prelievo, è importante considerare dove attendersi l'agente patogeno. A seconda della diagnosi sospettata, dovrebbero essere preferiti i seguenti siti, ad esempio: per l'**adenite equina** (Sc. equi equi), un tampone nasale profondo o un campione di lavaggio della tasca gutturale; in caso di **polmonite** è meglio una lavanda broncoalveolare rispetto ad un tampone nasale; nella **dermatofilosia equina** (*Dermatophilus congolensis*), croste cutanee o impronta di lesioni fresche con liquido sieroso su un vetrino da microscopio, ma non peli tagliati; per la **piodermite**, un tampone della lesione cutanea o peli strappati; in caso di **ascesso** è meglio un tampone prelevato dall'interno della capsula dell'ascesso che direttamente dal pus; per la **cistite**, il prelievo con il catetere o la cistocentesi danno esiti più attendibili rispetto all'invio dell'urina spontanea, che può essere contaminata da batteri.

Perché il laboratorio ha bisogno di conoscere il sito di campionamento?

A seconda di dove è stato prelevato il campione, utilizzeremo terreni di coltura speciali o adatteremo le condizioni della coltura (temperatura, ossigeno, tempo

di incubazione) per rilevare i patogeni tipici. Coltivare una coltura senza avere informazioni di base può comportare il mancato rilevamento di infezioni importanti.

Molto importante: la valutazione dell'antibiogramma secondo le linee guida internazionali (CLSI) può essere eseguita correttamente solo se è noto da dove è stato isolato il rispettivo patogeno. Se il sito non è specificato, non possiamo creare un antibiogramma che possa essere utilizzato secondo gli standard moderni!

CITOLOGIA

Come vengono preparati i campioni citologici

I liquidi vengono lavorati come uno striscio di sangue, mentre i tamponi/citospazzole vengono fatti rotolare sul vetrino. È meglio centrifugare (eliminare) i fluidi a basso contenuto di cellule e quindi strisciare il sedimento (indicare "sedimento").

Cosa è necessario osservare per garantire una buona valutazione dei preparati

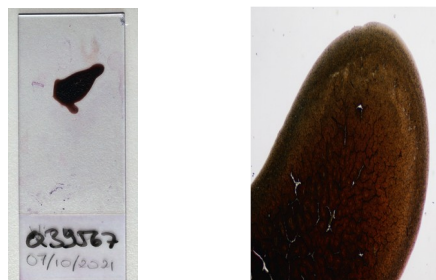
Per evitare l'autolisi, i vetrini citologici dovrebbero essere già preparati nella tua struttura. Gli artefatti si riducono se lo striscio non è troppo spesso e si stende con poca pressione. Asciuga sempre il vetrino all'aria e non riscaldarlo per fissarlo o non coprirlo.

È assolutamente necessario spedire i vetrini asciutti all'interno dei portavetrini in modo che le cellule non vengano danneggiate. I vapori di formalina renderanno illeggibili i vetrini, quindi invia eventuali campioni istologico fissati in formalina in un sacchetto separato. I campioni citologici non devono essere conservati in frigorifero poiché l'acqua potrebbe condensare. Infine, ma non meno importante, la storia clinica è molto importante per poter fornire un'interpretazione corretta e utile.

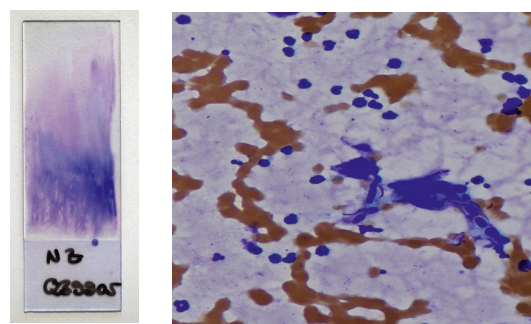
ISTOPATOLOGIA

Come vengono preparati i campioni istologici
Preleva il materiale da siti diversi per avere un campione rappresentativo. Evita il tessuto necrotico. I tumori devono essere resecati il più completamente possibile per valutarne i margini. La dimensione del campione ideale varia da 0,4 a 1,0 cm di diametro. Soprattutto con i campioni di piccole dimensioni, assicurati che ci siano sufficienti campioni. Evita gli

artefatti durante la raccolta, derivanti, ad esempio, da elettrocoagulazione, rottura e schiacciamento.



Vetrino troppo spesso: le cellule non possono venire identificate



Vetrino eseguito correttamente: le cellule sono identificate (ife fungine)

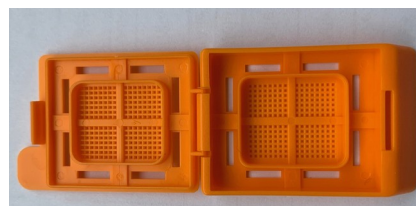
Immagine: Laboklin

Per la fissazione con formalina, utilizza il 10% di formalina (= 4% di formaldeide) con un rapporto tessuto/formalina di 1:10, o meglio 1:20; non utilizzare altri fissativi (come l'alcol), altrimenti è meglio inviare il campione non fissato – quest'ultimo di solito non è problematico se viene ricevuto il giorno successivo. A temperature sotto lo zero, l'aggiunta di un po' di alcol impedisce il congelamento.

A cosa è necessario prestare attenzione per garantire una buona valutazione dei preparati

Ricordati di utilizzare contenitori a prova di perdite e di rottura durante la spedizione. Per biopsie molto piccole, la spedizione in cassette di inclusione può impedire la rottura del campione. La storia clinica aiuta il patologo a focalizzare l'attenzione sulle alterazioni rilevanti.

Questo è indispensabile per una buona valutazione!



Cassetta di inclusione

Immagine: Laboklin