



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**Gli errori preanalitici in Medicina Veterinaria:
interferenza dell'emolisi, della lipemia e
dell'ittero nelle analisi di laboratorio del cane e
del gatto.**

CANDIDATA
Antonella Iacomini

RELATORE
Prof. George Lubas

CORRELATRICE
Dr.ssa Alessandra Gavazza

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

INDICE

Riassunto/Abstract.....	5
<u>PARTE GENERALE</u>	6
CAPITOLO 1.....	7
INTRODUZIONE.....	7
CAPITOLO 2.....	8
GLI ESAMI DI LABORATORIO: IMPORTANZA NEL CONTESTO DELL'ESAME CLINICO.....	8
2.1 <i>Controllo qualità del laboratorio nella fase preanalitica: generali</i>	9
2.2 <i>Confronto tra diagnostica di laboratorio in medicina umana e veterinaria</i>	10
2.3 <i>Interferenti nella diagnostica di laboratorio: emolisi, lipemia ed ittero</i>	13
CAPITOLO 3.....	16
GESTIONE DEL CAMPIONE: PRINCIPI DA RISPETTARE.....	16
3.1 <i>Criteri per l'accettabilità del campione</i>	16
3.2 <i>Identificazione del campione</i>	18
3.3 <i>Campionamento</i>	18
3.4 <i>Manipolazione del campione</i>	19
3.5 <i>Trasporto al laboratorio</i>	20
CAPITOLO 4.....	22
TECNICHE DI ANALISI IN BIOCHIMICA CLINICA.....	22
4.1 <i>La spettrofotometria</i>	22
4.2 <i>La qualità delle misurazioni e delle tecniche utilizzate</i>	27
CAPITOLO 5.....	29
L'EMOLISI.....	29
5.1 <i>Cause che portano alla formazione dell'emolisi</i>	30
5.2 <i>Metodiche per determinare la concentrazione di emoglobina</i>	33
5.3 <i>Cause di variazione della concentrazione di emoglobina</i>	34
5.4 <i>Interferenza dell'emolisi sui risultati delle analisi</i>	35
5.5 <i>Azioni correttive per limitare l'emolisi</i>	37
CAPITOLO 6.....	40

LA LIPEMIA.....	40
6.1 Cause di lipemia	40
6.2 Interferenza della lipemia sui risultati delle analisi	42
6.3 Azioni correttive per limitare la lipemia	42
CAPITOLO 7.....	44
L'ITTERO.....	44
7.1 Cause di ittero	44
7.2 Interferenza dell'ittero sui risultati delle analisi	45
CAPITOLO 8.....	46
ALTRI ERRORI PREANALITICI.....	46
8.1 Campioni inadeguati in ematologia e coagulazione.....	46
<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	48
CAPITOLO 9.....	49
CAPITOLO 10.....	50
MATERIALI E METODI	50
10.1 MATERIALI	50
10.1.1 Strumenti	50
10.1.1.1 Sede di Pisa	50
10.1.1.2 Sede di Nantes	52
10.2 METODI	57
10.2.1 Metodiche dal campionamento alla validazione dei risultati del profilo biochimica della sede di Pisa	57
10.2.2 Metodiche per il controllo di qualità.....	58
10.2.3 Raccolta retrospettiva dei dati	59
10.2.4. Metodiche dal campionamento alla validazione dei risultati del profilo biochimico della sede di Nantes	59
10.2.4.1 Metodiche per il controllo di qualità	62
10.2.4.2 Raccolta retrospettiva dei dati	63
10.2.4.3 Raccolta prospettica dei dati	63
10.2.5 Analisi statistica.....	66

CAPITOLO 11	68
RISULTATI.....	68
<i>11.1 Risultati dello studio retrospettivo dei dati su emolisi, lipemia ed ittero.....</i>	<i>68</i>
<i>11.2 Risultati dello studio prospettico su emolisi, lipemia ed ittero.....</i>	<i>73</i>
CAPITOLO 12.....	78
CONCLUSIONI.....	78
BIBILOGRAFIA.....	82
RINGRAZIAMENTI.....	86

Riassunto

Parole chiave: errori preanalitici, emolisi, lipemia, ittero, cane, gatto.

Gli errori preanalitici sono le più frequenti problematiche di laboratorio in patologia clinica veterinaria e umana. I campioni che presentano emolisi, lipemia e ittero rendono difficile dosare e interpretare, in modo accurato, vari analiti di laboratorio. Questa tesi presenta due sezioni di studio. Una prima sezione (studio retrospettivo Ottobre 2010-2013) ha documentato la presenza di campioni con alterazioni preanalitiche, osservata nei due laboratori universitari di patologia clinica veterinaria, che servono gli ospedali didattici (Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa ed École Vétérinaire Oniris di Nantes, Francia). I dati raccolti sono stati analizzati statisticamente per valutare la prevalenza e la distribuzione dei campioni con alterazioni preanalitiche. Nella struttura di Pisa, sono stati rilevati su un totale di campioni analizzati di 10.905 cani e 1.981 gatti, rispettivamente 551 (5.05%) e 147 (7.42%) campioni con alterazioni preanalitiche. Nella struttura di Nantes, su un totale di campioni analizzati di 6.773 cani e 5.095 gatti sono stati invece individuati, rispettivamente, 301 (4.44%) e 181 (3.55%) campioni con alterazioni preanalitiche. La comparazione nei campioni di cane e gatto, rispettivamente, tra la quantità di colesterolo o di trigliceridi e la stima visiva della lipemia e tra la quantità di bilirubina e la stima visiva dell'ittero, ha evidenziato che non esiste relazione tra queste due variabili (dosaggio analita/stima-visiva operatore). Nella seconda sezione (studio prospettico effettuato nel laboratorio di Nantes, per 3 mesi) è stata dosata l'emoglobina in 27 campioni emolitici, il colesterolo e i trigliceridi in 20 campioni lipemici e la bilirubina in 12 campioni itterici, al fine di comparare la quantità di questi analiti con la stima visiva delle modificazioni preanalitiche, osservata dall'operatore. Nei 20 campioni lipemici, sono stati anche dosati, prima e dopo centrifugazione: albumina, fosfatasi alcalina, alanina aminotransferasi, creatinina, urea che non hanno mostrato nessuna evidenza statistica di variazione; mentre colesterolo, proteine totali e trigliceridi hanno evidenziato differenze statisticamente significative. È stato evidenziato come, nella struttura di Pisa, vengono inviati un numero maggiore di campioni con alterazioni preanalitiche rispetto a quello di Nantes e come la procedura di centrifugazione comporti la possibilità di poter dosare più accuratamente colesterolo, proteine totali e trigliceridi.

Abstract

Preanalytical errors in Veterinary Medicine: hemolysis, lipemia, icterus interference on laboratory tests in dogs and cats.

Keywords: preanalytical errors, hemolysis, lipemia, icterus, dog, cat.

The preanalytical errors are the most common problems in veterinary and human clinical pathology laboratory. Samples showing hemolysis, lipemia, and icterus are difficult to measure and interpret, accurately, various laboratory analytes. This thesis presents two study sections. The first section (retrospective study October 2010 to 2013), has documented the presence of samples with preanalytical alterations, observed in two university laboratories of veterinary clinical pathology that serve the teaching hospitals (Department of Veterinary Science, University of Pisa and École Vétérinaire Oniris of Nantes, France). The collected data were statistically analyzed to assess the prevalence and distribution of the samples with abnormal preanalytical alteration.

In the facility of Pisa, into a total of analyzed samples of 10.905 dogs and 1.981 cats, respectively, 551 (5.05%) and 147 (7.42%) samples with preanalytical alterations were detected. In the facility of Nantes, into a total of analyzed samples of 6.773 dogs and 5.095 cats, respectively, 301 (4.44%) samples and 181 (3.55%) samples with preanalytical alterations were instead identified. The comparison in samples of dog and cat, respectively, between the amount of cholesterol or triglycerides and the visual estimation of lipemia and between the amount of bilirubin and icterus visual estimation, showed that there is no relationship between these two variables (analyte dosage/visual estimation by operator). In the second section (prospective study carried out in the laboratory of Nantes for 3 months) hemoglobin was measured in 27 hemolytic samples, cholesterol and triglycerides in 20 lipemic samples, bilirubin in 12 icteric samples in order to compare the amount of these analytes with the visual estimation of the preanalytical modifications, observed by the operator. The 20 lipemic samples, were also assayed before and after centrifugation for: albumin, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, creatinine, urea that showed no statistical evidence of variation; while cholesterol, total protein, and triglycerides showed statistically significant differences. It has been shown how, in the facility of Pisa are sent a greater number of samples with preanalytical alterations compared to that of Nantes and the procedure of centrifugation involves the possibility of determining more accurately cholesterol, total protein and triglycerides.

PARTE GENERALE

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La fase preanalitica è considerata la parte del processo diagnostico i cui si concentra la maggior parte degli errori di laboratorio. L'interferenza dell'emolisi, della lipemia e dell'ittero sui risultati delle analisi di laboratorio è un problema da prendere in considerazione sia in campo umano che veterinario. I tassi di errore totali (preanalitici, analiti e postanalitici) dei laboratori umani si riferiscono ad un intervallo che va da 0,05-3% di tutti i campioni testati, con una percentuale di errore preanalitico compresa tra 32 e 75%⁽⁵⁾. Uno studio su un laboratorio veterinario ha riportato, un tasso annuale di errori di 0,7-1,3%, considerando tutti i campioni in un periodo di otto anni (332,882), e di questi errori, il 52-77% derivano dalla fase pre-analitica, e più precisamente il 5,8% da campioni emolitici ed il 3,0% da campioni lipemici⁽⁴³⁾. Poiché gli studi bibliografici presenti derivano, quasi esclusivamente, da lavori svolti in medicina umana, è nata l'idea di approfondire l'argomento anche in Medicina Veterinaria.

Questa tesi presenta due sezioni di studio, svolte presso due laboratori di Patologia Clinica Veterinaria: il Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa e l'École Vétérinaire Oniris di Nantes. Lo scopo principale è stato quello di verificare la prevalenza dei campioni con alterazioni preanalitiche nei due laboratori. Attraverso lo studio comparativo tra dosaggio dell'analita interferente (emoglobina, colesterolo e trigliceridi, bilirubina) e stima visiva, osservata dall'operatore, dei campioni lipemici ed itterici per Pisa e dei campioni emolitici, lipemici ed itterici per Nantes, è stato possibile, inoltre, verificare se esiste un'associazione tra le due determinazioni (strumentale ed umana). Nella seconda parte, è stata effettuata una valutazione di alcuni analiti (albumina, proteine totali, fosfatasi alcalina, alanina aminotransferasi, colesterolo, trigliceridi, urea e creatinina) in campioni lipemici a centrifugazione basale e dopo centrifugazione a 4°C, al fine di comparare i due risultati e verificare se esistono differenze statisticamente significative.

CAPITOLO 2

GLI ESAMI DI LABORATORIO: L'IMPORTANZA NEL CONTESTO DELL'ESAME CLINICO

Gli esami di laboratorio hanno acquisito, nel tempo, un ruolo determinante per il medico veterinario nello sviluppo di un piano diagnostico che analizzi approfonditamente i vari aspetti delle patologie del cane e del gatto⁽¹⁾, ed è utile richiamare i concetti base circa la loro utilità:

- aiutare nella ricerca della diagnosi,
- fornire notizie sulla gravità della malattia,
- ottenere informazioni sulla prognosi,
- valutare la risposta al trattamento.

Nella gestione clinica dei casi occorre seguire corrette procedure, avvalendosi della diagnostica di laboratorio:

- a. porre sempre una diagnosi differenziale iniziale sulla base dei rilievi clinici, affinché possano essere decisi quali esami siano necessari da eseguire (formulazione del piano diagnostico);
- b. porre una domanda specifica e significativa capendo se, un particolare test di laboratorio è in grado di produrre una risposta utile;
- c. richiedere una selezione di alcuni test correlati tra loro per il caso clinico e non limitarsi a test specifici e singoli: spesso, un solo esame non è patognomonico di una particolare malattia;
- d. di interpretare il dato di laboratorio considerando la metodologia impiegata dal laboratorio per la sua determinazione, l'utilità clinica e le limitazioni sia tecniche, sia interpretative;
- e. considerare i risultati ottenuti dal laboratorio nel contesto dell'intero quadro clinico⁽²⁾.

2.1 Controllo qualità del laboratorio nella fase preanalitica: generalità

In medicina di laboratorio, il termine “qualità” dovrebbe essere definito come la garanzia che, durante tutto il processo, ogni singolo passaggio venga eseguito correttamente, garantendo così un potere medico decisionale affidabile e una cura del paziente efficace⁽³⁾. A tal proposito, ogni laboratorio dovrebbe impostare dei sistemi di controllo di qualità per ridurre al minimo alcuni errori che, potrebbero influire sui risultati dei test. I risultati dei test vengono solitamente interpretati per confronto con valori di riferimento, ottenuti da un gruppo di animali sani e conoscendo quali processi patologici possono modificarli. I principi della metodologia di analisi dei dati e l’identificazione di eventuali risultati anomali, dovrebbero anche essere valutati in funzione delle loro conseguenze cliniche.

Sebbene una maggiore automazione, tecniche avanzate e una sofisticata tecnologia dell’informazione hanno notevolmente migliorato le prestazioni e la qualità nei test di laboratorio medico, diversi studi dimostrano che si verificano quantità significative di errori⁽⁴⁾.

Secondo l’International Organization for Standardization (ISO), un errore di laboratorio è “il fallimento di un’azione pianificata o l’utilizzo sbagliato di un piano per raggiungere un obiettivo, verificatosi in ogni fase del ciclo di laboratorio, dalla richiesta degli esami alla formulazione dei risultati e dalla loro corretta interpretazione”⁽⁵⁾.

I momenti principali in cui si possono verificare eventuali errori, sono costituiti da tre fasi:

- 1) Fase pre-analitica: dal campionamento alla manipolazione del campione;
- 2) Fase analitica: dall’esecuzione del test alla refertazione;
- 3) Fase post-analitica: dall’analisi all’interpretazione dei risultati⁽⁶⁾.

Gli errori preanalitici sono i più comuni tra gli errori di laboratorio in patologia clinica. I tassi di errore totali dei laboratori umani si riferiscono ad un intervallo che va da 0,05-3% di tutti i campioni testati, con una percentuale di errore preanalitico compresa tra 32 e 75%. Un lavoro in campo veterinario ha riportato, un tasso annuale di errori di laboratorio di 0,7-1,3%, considerando tutti i campioni in un periodo di otto anni, e di questi errori, il 52-77% derivano dalla fase pre-analitica⁽⁵⁾.

La fase pre-analitica è considerata di fatto:

– la parte del processo diagnostico nella quale si concentrano la maggior parte degli errori (dal 45% al 70% di tutti gli errori di laboratorio), secondo vari autori;

- la parte del processo diagnostico che espone maggiormente gli operatori sanitari al rischio biologico;
- la parte del processo diagnostico che, in maggior misura, si sviluppa al di fuori del diretto controllo del laboratorio⁽⁷⁾.

La maggior parte degli errori rilevati, si verifica quindi, nelle fasi preanalitiche perché, si tratta di processi manuali e non automatici e, di solito, sono dovuti all'errore umano, ma potrebbero essere ridotti se, tali processi venissero descritti sotto forma di Procedure Operative Standard e posti all'interno di un sistema di registrazione dell'errore, utilizzato per istituire azioni correttive e preventive⁽⁵⁾.

2.2 Confronto tra diagnostica di laboratorio in medicina umana e in veterinaria

La moderna Medicina di Laboratorio svolge un ruolo di assoluta rilevanza nella prevenzione, diagnosi, trattamento e “follow-up” di tutte le patologie (basti considerare, in merito, che il 60%-70% delle decisioni cliniche si basa su dati di laboratorio)⁽⁷⁾.

Al giorno d'oggi, è possibile eseguire un'ampia gamma di analisi in laboratori allestiti all'interno di cliniche veterinarie. Pertanto, il veterinario si trova spesso a dover scegliere se allestire un laboratorio interno o utilizzarne uno esterno: non esiste un metodo sicuro per calcolare se per una struttura veterinaria sia più conveniente investire in un laboratorio interno o meno. In ogni caso, la via migliore per ottenere velocità di risultato, accuratezza, qualità del servizio e supporto personale necessari per una diagnosi affidabile e tempestiva potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo combinato di test eseguibili all'interno della propria struttura e di servizi forniti da laboratori esterni.

Alcune cliniche veterinarie eseguono in ambulatorio la maggior parte delle analisi, perché preferiscono tempi di risposta più rapidi o non si fidano dei laboratori esterni locali. Il vantaggio principale sta proprio in un tempo di attesa dei risultati molto rapido e quindi una reazione molto rapida al problema del paziente con soddisfazione del cliente e la minimizzazione degli errori pre-analitici, associati al trasporto del campione. I laboratori esterni di riferimento offrono, tuttavia, analisi meno costose, un miglior controllo qualità, maggiore accuratezza, una più ampia gamma di test e un personale qualificato con esperienza che comprende meglio i problemi legati a campioni animali. La maggior parte delle procedure viene eseguita bene anche nei laboratori di umana (le analisi proteiche potrebbero essere l'unica eccezione, perché danno esiti imprecisi). I campioni ematologici dei cani, in genere, sono bene gestiti per via delle somiglianze tra il sangue umano e quello

canino; il sangue dei gatti, invece, presenta eritrociti più piccoli, grosse piastrine e frequenti aggregati piastrinici che causano errori.

La chiave per un uso efficace di questi laboratori, sta nella comunicazione: il personale spiegherà come fornire i campioni in maniera adeguata. Se arriva un campione insoddisfacente o quando le istruzioni o l'etichetta sono incomplete, occorre contattare il veterinario o decidere arbitrariamente cosa fare del campione⁽⁸⁾.

In quasi tutti i paesi europei, Italia inclusa, i laboratori diagnostici veterinari possono richiedere ad organismi, appositamente preposti, l'accreditamento secondo definiti sistemi di qualità, per esempio ISO 17025, (che definisce i "requisiti generali per la competenza di laboratorio che eseguono test o calibrazioni diagnostiche").

Questi sistemi di accreditamento di solito non vengono richiesti o applicati a laboratori interni alle cliniche, per i quali è compito della struttura stessa assicurare sistemi di produzione di risultati attendibili, implementare le procedure atte a identificare e correggere eventuali errori⁽⁶⁾.

Nel dicembre 2009, il comitato della Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards ha formulato un documento completo sugli standard di controllo qualità applicabili a tutti i laboratori veterinari: le *Quality Assurance Guidelines*, pubblicate sul sito web della Società. Queste linee guida sono destinate all'uso da parte dei laboratori diagnostici veterinari e laboratori di ricerca veterinari, che non sono coperti dalle norme US Food and Drug Administration Good Laboratory Practice. Sono state suddivise in tre sezioni: (1) fattori generali di analisi per le prestazioni di laboratorio veterinario e confronto; (2) ematologia, emostasi, e test di compatibilità, (3) chimica clinica, citologia, e analisi delle urine.

Queste linee guida non intendono essere esaustive, anzi, forniscono linee guida minime per la garanzia di qualità e il controllo di qualità per le analisi di laboratorio veterinario e una base per i laboratori, per valutare le loro pratiche attuali, determinare le aree di miglioramento, e la guida continua di sviluppo e di educazione professionali.

A causa della mancanza di regolamentazione governativa delle prestazioni di laboratorio in medicina veterinaria, i veterinari, idealmente, dovrebbero dimostrare un impegno di auto-monitoraggio e regolazione delle prestazioni del laboratorio all'interno della professione⁽⁹⁾.

Molti veterinari seguono le raccomandazioni dei fornitori della strumentazione diagnostica, alcuni dei quali affermano che i rispettivi sistemi, non richiedono un monitoraggio di controllo di qualità, anche se questo è fuorviante e contrario alle linee guida ASVCP.

Dal punto di vista tecnico, la strumentazione di laboratorio esegue una complessa serie di attività, come pipettaggio automatizzato, diluizioni, miscelazione, misurazioni con la corrente; componenti come tubi, valvole, circuiti stampati e le parti in movimento sono soggette a degrado. Qualsiasi difetto di sviluppo o guasto, in un sistema elettromeccanico così complesso, ha un impatto sull'integrità dei risultati dei test di laboratorio definitivi, che il sistema stesso genera. Il monitoraggio del controllo di qualità è stato inventato per rilevare questo impatto sui risultati dei test di laboratorio prima di mettere i dati a disposizione del medico. Questo è stato l'obiettivo dei programmi di controllo di qualità giornaliero in corso di attuazione, come procedura operativa standard nei laboratori clinici.

Dal punto di vista clinico, un programma di controllo di qualità consente al medico di interpretare i dati di laboratorio con maggiore fiducia.

Ad oggi, la questione di ciò che costituisce un programma di controllo di qualità ragionevole per un laboratorio veterinario, non è stata ancora trattata e si fa uso dei modelli di programmi di controllo di qualità dei laboratori medici umani. Le linee guida standard, precedentemente citate, richiedono un'analisi dei materiali di controllo ad ogni turno di laboratorio. I programmi sono in genere costituiti da tre livelli per l'ematologia, noti come basso, normale e alto, e due livelli per la biochimica clinica, noti come normale e anormale. Ciascun laboratorio può inserire campioni di controllo supplementari durante l'esecuzione di un numero elevato di campioni. Ciò può comportare una richiesta eccessiva di tempo e un consumo esagerato di materiali, tanto da considerare queste linee guida scoraggianti per il laboratorio veterinario.

Nell'evoluzione dei laboratori clinici umani e veterinari, sono stati stabiliti programmi di controllo interlaboratorio, in cui singoli laboratori vengono confrontati con un grande numero di altri laboratori, valutando le analisi di una aliquota dello stesso campione. L'entità amministrativa distribuisce aliquote di un singolo campione ad ogni laboratorio che partecipa, il quale analizza il campione e restituisce i risultati.

I laboratori partecipano al programma 3-4 volte l'anno.

Successivamente il laboratorio riceve un report statistico che indica il suo risultato, comparato ad un valore medio e la dispersione sulla base dei risultati di tutti i laboratori.

Alcuni anni fa, la Veterinary Laboratory Association (VLA) ha esortato i laboratori veterinari a partecipare a un programma di controllo qualità interlaboratorio, ma pochi hanno aderito all'iniziativa. Ciò è attribuibile, in gran parte, alla mancanza di educazione e sensibilizzazione sui programmi di controllo in generale ed, inoltre, un programma di quel genere, non va a sostituire il programma di monitoraggio giornaliero: una volta per trimestre

è una frequenza troppo bassa per determinare se esiste un problema di sistema. Pertanto, i programmi interlaboratorio sono solo un supplemento, ma ciò potrebbe cambiare in futuro, se, per esempio, un fornitore offrisse al suo gruppo di utenti, un programma simile, in cui gli utenti stessi possano confrontare i loro risultati con altri utenti della stessa famiglia di strumenti⁽¹⁰⁾.

2.3 Interferenti nella diagnostica di laboratorio: emolisi, lipemia ed ittero.

Gli artefatti, definiti come una concentrazione o un'attività falsamente aumentata o diminuita, rendono difficile interpretare in modo accurato gli esami di laboratorio e possono interferire con la misurazione di un unico o numerosi analiti e, nel caso in cui ne venga alterato solamente uno, anche tutti gli altri devono essere attentamente valutati. I campioni che presentano emolisi, lipemia e iperbilirubinemia sono quelli più colpiti da artefatti e la loro interferenza analitica è la preoccupazione più comune in medicina di laboratorio⁽⁸⁾.

Questi risultati alterati possono portare infatti, a ripetere le prove, ad una non corretta interpretazione, ad una diagnosi sbagliata, fino ad arrivare ad un intervento potenzialmente inappropriato con esito sfavorevole per i pazienti.

Emolisi, ittero e lipemia interferiscono con i metodi spettrofotometrici e l'emolisi è l'interferente più comune. Questa interferenza è causata principalmente da componenti rilasciati dai globuli rossi e, sebbene l'interferenza spettrale diretta su analizzatori di chimica sia stata minimizzata con analisi bicromatiche e cinetiche, il contenuto di globuli rossi come potassio e lattato deidrogenasi, possono aumentare falsamente tali componenti, nel plasma o nel siero.

L'emolisi può verificarsi in vivo, ma il problema principale che hanno i laboratori clinici è che si verifica durante e dopo il prelievo dei campioni.

La bilirubina può interferire con l'analisi spettrale, ma anche chimicamente in alcune reazioni. Normalmente, le concentrazioni di bilirubina pari a 2,05 mg/dl sono, clinicamente definite, come iperbilirubinemia, mentre i campioni itterici hanno concentrazioni di bilirubina pari a 5,9 mg/dl. Un campione lipemico è il risultato di elevate concentrazioni di chilomicroni e lipoproteine: la lipemia può interferire in qualsiasi test che si basa sulla rilevazione della trasmissione della luce o dispersione o spostamento di volume. La presenza di emoglobina, bilirubina e lipidi in un campione può causare quindi, una deviazione positiva o negativa del risultato nella misurazione di molti analiti⁽¹¹⁾.

I loro potenziali effetti sui risultati dei test di chimica clinica sono spesso riconosciuti, ma i dati relativi alla loro influenza su specifici analiti secondo metodo, strumento e specie, sono,

o sconosciuti o derivano solo da fonti bibliografiche. Gran parte dei dati di interferenza, sviluppati da produttori di strumenti di chimica clinica sono stati determinati utilizzando siero umano. La conoscenza degli effetti delle sostanze che interferiscono sui risultati dei test è fondamentale per la corretta interpretazione dei dati di laboratorio⁽¹²⁾.

Uno studio sperimentale, in medicina umana, riporta gli impatti di emolisi, ittero e lipemia su campioni di laboratorio analizzati su Roche Cobas 6000, un analizzatore multicanale spettrofotometrico, il cui sistema è completamente automatico, controllato da un computer e progettato per l'analisi di saggi di routine chimica, immunosaggi e farmaci terapeutici. In una certa misura, il sistema, simile alla maggior parte degli analizzatori moderni, riduce gli effetti di interferenza spettrali ed è in grado di rilevare emolisi, ittero e lipemia nei campioni, generando valori quantitativi per le principali sostanze interferenti.

I dati ottenuti indicano che alcuni valori non sono pienamente concordi con quelli forniti dal fornitore e vengono dimostrati ulteriori accertamenti di interferenza non riportati dal costruttore né pubblicati in letteratura.

Sono state osservate variazioni, (positive o negative), di analiti come il potassio, LDH, ammoniaca, AST, ALT, CK, Fe²⁺, causate da interferenze dovute all'emoglobina o dall'aumentato rilascio di componenti cellulari di eritrociti durante emolisi. L'emoglobina inizia ad assorbire circa 340nm e quindi colpisce metodi non cinetici, basati su proprietà di assorbanza di NADH o NADPH. Allo stesso modo, l'interferenza della bilirubina deriva dalle sue proprietà spettrali e dalla sua capacità di reagire chimicamente con altri reagenti, con conseguenti valori di analiti diminuiti, come la concentrazione di creatinina.

Questo studio ha permesso di avere informazioni più precise su quale analita può essere colpito e in quale misura, rispetto ad un'ispezione visiva del campione⁽¹¹⁾.

In campo veterinario, nel 1992, è stato condotto uno studio su sieri bovini, canini e felini, considerati "normali", per valutare l'interferenza di emolisi, lipemia ed ittero su 25 analiti, utilizzando reagenti commerciali e un analizzatore automatico (Dacos, Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA). Sono state trovate differenze evidenti legate alla specie nella risposta ad almeno una sostanza d'interferenza aggiunta a AST, ALT, colesterolo, CK, proteine totali, globuline ed urea. I restanti analiti sono stati colpiti in una relazione dose-risposta e solo alle più alte concentrazioni di sostanze interferenti. Le differenze di specie sono stati notevoli, soprattutto per ciò che riguarda le proteine totali. Quest'ultime, insieme alle globuline sono state influenzate positivamente dall'aggiunta di lipidi, sia nel siero bovino sia equino, ma non si sono verificati gli stessi effetti nei sieri di cane e gatto. I dati

presentati, a causa delle ampie variazioni di reagenti e strumenti diversi, sono validi solo per i reagenti specifici per lo strumento d'analisi utilizzato⁽¹²⁾.

CAPITOLO 3

GESTIONE DEL CAMPIONE: PRINCIPI DA RISPETTARE

La qualità del campione è condizione necessaria, anche se non sufficiente, per la qualità del risultato degli esami di laboratorio. Come precedentemente citato, nuova attenzione è stata posta al problema da linee guida internazionali, da procedure di controllo della qualità e della performance, dagli indicatori di qualità della fase extra-analitica. Tuttavia una adeguata garanzia della qualità, avviene solo attraverso un controllo esteso lungo la fase analitica e post-analitica e il coinvolgimento del personale preposto alla raccolta, trattamento e conservazione del campione biologico. Questo è un compito fondamentale dei professionisti della Medicina di Laboratorio⁽¹³⁾.

3.1 Criteri per l'accettabilità dei campioni

L'adeguatezza del campione è un fattore di criticità della fase preanalitica, che influenza l'accuratezza e il successivo utilizzo clinico dei risultati di laboratorio ottenuti. Diversi studi riportati in letteratura, hanno evidenziato quali siano i problemi e l'influenza delle variabilità preanalitiche (identificazione, raccolta, trattamento, trasporto, temperatura, tempo di consegna del campione e presenza di interferenti endogeni), che influenzano i test biochimico-clinici, con conseguente rifiuto del campione per non adeguatezza, e, come l'accettazione di campioni compromessi provochino risultati e informazioni errate. La valutazione complessiva della qualità del campione non è limitata alla fase della sua accettazione per l'analisi, ma si ha, dopo averlo processato, in fase di validazione dei dati, con il riscontro di risultati anomali, associati ad allarmi strumentali. Inoltre, la sempre più diffusa introduzione in laboratorio di sistemi di automazione totale (sistemi che integrano la fase analitica con la fase preanalitica) e il gran numero di campioni da processare, rendono problematica l'osservazione diretta, dopo centrifugazione, del campione per rilevare l'eventuale presenza di un interferente endogeno che possa pregiudicare la qualità e l'accettabilità del campione.

L'impatto sull'organizzazione giornaliera del laboratorio, di campioni che non rispondono ai requisiti di adeguatezza, è la ri-lavorazione dei nuovi campioni richiesti in sostituzione di quelli rifiutati, con inconvenienti per il paziente dovuti ad un prelievo aggiuntivo, allungamento del tempo di attesa dei risultati e conseguente ritardo nella diagnosi e terapia⁽¹³⁾.

Utilizzare indicatori di qualità come strumenti per identificare e raccogliere informazioni su ogni caratteristica anomala che ha portato al rifiuto del campione, (modalità di raccolta, trasporto e conservazione), comporta la verifica di una serie di azioni che coinvolgono più figure professionali. È competenza specifica del professionista della medicina di laboratorio, adottare le strategie idonee per ridurre i casi di non accettabilità del campione, standardizzando le procedure operative, predisponendo i limiti di accettabilità del proprio laboratorio e sensibilizzando tutti gli operatori, coinvolti nelle criticità e nella gestione della fase preanalitica, con una azione di informazione e aggiornamento costante, e costruire procedure definite ed efficaci per un miglioramento continuo della qualità del processo.

Il monitoraggio continuo con indicatori di qualità del laboratorio secondo procedure standardizzate inizia già nel 1989, in medicina umana, con il programma Q-Probes⁴ e successivamente, nel 1998, con il programma Q-Tracks⁵ del College of American Pathologists (CAP) per le verifiche delle performance dei laboratori clinici secondo i programmi di accreditamento. Il QT3-Laboratory Specimen Acceptability è uno strumento per il monitoraggio delle variabili preanalitiche di tutti i campioni di sangue destinati ad analisi biochimiche ed ematologiche, che prevede la valutazione settimanale del numero di campioni rifiutati, sul totale dei campioni ricevuti in laboratorio, e la motivazione per cui ogni campione primario non viene accettato. L'obiettivo del QT3 è di identificare e caratterizzare i campioni che non rispondono ai requisiti di accettabilità e promuovere la stesura di protocolli operativi per la valutazione dei campioni, per il riconoscimento delle specifiche ragioni che hanno comportato il loro rifiuto e per promuovere programmi di formazione per il miglioramento della fase preanalitica⁽¹³⁾.

Le informazioni riguardanti i requisiti dei campioni, quali la raccolta, la manipolazione e le procedure di consegna o spedizione per qualsiasi analisi eseguita in laboratorio, dovrebbero essere a disposizione dei clienti per via elettronica, sotto forma di materiale scritto, come ad esempio un manuale dei servizi di laboratorio, schede informative speciali. Il foglietto illustrativo degli strumenti d'analisi fornisce descrizioni dettagliate circa l'adeguatezza dei campioni, compresi i tubi di raccolta e manipolazione. I campioni devono essere raccolti secondo le pratiche standard e trasportati in laboratorio in modo tempestivo, in condizioni appropriate per il tipo di campione e la sua stabilità.

La deviazione dai protocolli raccomandati, può influenzare negativamente i risultati del test⁽⁹⁾.

3.2 Identificazione del campione

I campioni devono essere identificati con informazioni pertinenti, come stabilito dal laboratorio: nome del proprietario, identificazione dell'animale, della specie, segnalamento, data di raccolta, il nome della clinica o del veterinario richiedente le analisi, indirizzo, telefono e fax, indirizzo di posta elettronica e il sito da cui il campione è stato raccolto. I dati corrispondenti dovrebbero essere posizionati sia sul modulo di presentazione, sia sul contenitore. I test(s) richiesti devono essere chiaramente contrassegnati o indicati sul modulo di presentazione⁽⁹⁾.

Tutte queste informazioni, insieme ai test richiesti, devono essere inseriti correttamente nel sistema informativo di laboratorio (LIS); una volta entrati, tali informazioni possono essere utilizzate per monitorare la posizione e la conservazione adeguata del campione. La suddivisione in aliquote dei campioni e la consegna alla sezione appropriata, all'interno del laboratorio o tra diversi dipartimenti dovrebbero essere coordinate. Qualsiasi problema con la qualità del campione, tra cui, ma non limitatamente a emolisi, lipemia, gelificazione del campione, o altri problemi di origine preanalitica, deve essere registrato e comunicato ai clienti e al personale di laboratorio. Se il grado di imprecisione, associata alla qualità del campione, può pregiudicare le decisioni cliniche, il test non dovrebbe essere eseguito sul campione in questione e i risultati non dovrebbero essere segnalati⁽⁹⁾.

La comunicazione tra il personale di laboratorio ed i clienti (interni ed esterni), dovrebbe essere tempestiva e cortese, soprattutto quando riguarda fattori preanalitici, ad esempio, moduli di presentazione incompleti o scarsa qualità del campione, che possono influenzare i risultati del test. I clienti devono essere informati dei tempi previsti per la ricezione dei risultati ed, eventuali loro reclami verbali o scritti, commenti e suggerimenti, devono essere documentati e trasmessi ad un livello adeguato di gestione: dovrebbero essere effettuate sia riunioni di gestione, sia revisioni organizzative sulle azioni correttive⁽⁹⁾.

3.3 Campionamento

Al momento del prelievo si deve cercare di raccogliere il miglior campione possibile in funzione dei test da eseguire; deve essere eseguito tramite un accesso venoso, solitamente, dalla vena giugulare per un prelievo di discrete quantità; dalla vena cefalica o safena per un prelievo di quantità ridotte⁽¹⁴⁾.

In genere, vengono impiegate siringhe la cui dimensione è in rapporto alla quantità di sangue da collezionare e in base alla taglia dell'animale. In linea di principio, si consiglia di utilizzare aghi, la cui dimensione sia la massima compatibile con il diametro del vaso, quindi

nel cane vanno bene aghi da 20 a 22 G, nel gatto si preferiscono aghi da 22 a 25 G e nei grossi animali aghi da 16 a 19 G (generalmente, viene utilizzato il sistema Vacutainer, un metodo costituito da provette sottovuoto con uno speciale portaprovetta/portaago ed un particolare ago). Il sito del prelievo, per evitare contaminazioni del campione e flebiti, dovrebbe essere ogni volta rasato e disinfettato e, anche per piccole campionature, viene effettuata una semplice disinfezione della zona laddove è sufficiente. Il prelievo va effettuato rapidamente e delicatamente, per evitare alterazioni cellulari e occorre trasferire il sangue, altrettanto rapidamente e delicatamente, in una apposita provetta idonea per il test che si vuole eseguire, dopo rimozione dell'ago dal corpo della siringa. Nel caso in cui, la provetta contenga anticoagulante, è necessario miscelare quanto prima con una serie di movimenti delicati per inversione, dopo averla chiusa con il tappo.

Durante il prelievo, l'eccessiva suzione tramite un ago di piccolo calibro, il passaggio del sangue dalla siringa alla provetta con notevole pressione, l'eccessiva pressione negativa che viene applicata sul sangue già presente nella siringa nel momento in cui si tenta di ritrovare la vena perduta, l'eccessiva stasi venosa durante il prelievo ematico, l'eccessiva agitazione della provetta e centrifugazione ad alta velocità, rappresentano tutte variabili preanalitiche che inducono emolisi e quindi, alterazioni nelle successive fasi del test con errate interpretazioni dei risultati⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

Le caratteristiche del campione sono molto influenzate anche dallo stato fisiologico dell'animale: se il prelievo viene effettuato su animali eccitati, timorosi o che hanno appena svolto esercizio fisico, si possono riscontrare neutrofilia e linfopenia così come l'iperglicemia è un riscontro frequente, soprattutto nei gatti stressati dalle procedure di prelievo; la disidratazione può determinare un aumento dell'ematocrito e infine l'assunzione di cibo può alterare il colesterolo, trigliceridi e glucosio, infatti si raccomanda il digiuno almeno per 12 ore prima del prelievo. Un importante svantaggio di un campione non a digiuno è di fatto, è la presenza di lipemia⁽¹⁴⁾.

3.4 Manipolazione del campione

Una volta che il campione è stato posto nelle apposite provette, deve essere processato il più rapidamente possibile. Se dal singolo campione prelevato si vogliono ottenere più provette, sarebbe opportuno trasferire, prima il campione in una provetta da siero e successivamente riempire quelle con anticoagulante, per evitare possibili contaminazioni. L'acido etilendiamino tetra acetico (EDTA) potrebbe interferire con le analisi determinando, un aumento della concentrazione di Potassio, una diminuzione della concentrazione del Calcio,

Magnesio e dell'attività sia della CreatinKinasi (CK) che della Fosfatasi Alcalina (ALP) e sebbene, conservi bene la forma delle cellule, dopo qualche ora si possono apprezzare alterazioni morfologiche, soprattutto a carico dei leucociti.

In caso di esami ematologici, è sempre buona norma fare strisci ematologici al momento del campionamento e farli asciugare rapidamente all'aria, non devono né essere refrigerati, né essere posti a contatto con vapori di formalina⁽¹⁴⁾.

I test biochimici possono essere effettuati sia su siero che su plasma, anche se molti laboratori preferiscono utilizzare il siero, (per questo è fondamentale conoscere le esigenze del laboratorio a cui si vorranno eventualmente mandare le analisi) per ridurre la probabilità di formazione di micro coaguli di fibrina. Infatti, i Sali di eparina legano la trombina, inibendo la formazione di coaguli e quindi, il sangue deve essere separato velocemente per ottenere il plasma. E' opportuno ricordare che, il plasma ottenuto da sangue intero e non separato immediatamente, può contenere dei piccoli coaguli, i quali potrebbero interferire con le procedure di analisi.

Il sangue nelle provette da siero, dovrebbe essere tenuto a temperatura ambiente (o di solito a bagnomaria a 37°C) per almeno 15-30 minuti, in modo che si formi il coagulo prima di essere centrifugato in una centrifuga monitorata riguardo velocità, tempo e temperatura. Se la centrifugazione avviene prima del completamento del coagulo possono formarsi dei coaguli di fibrina che creano interferenze con le analisi successive⁽¹⁶⁾.

Conoscere la stabilità dei costituenti ematici e il modo di conservazione dei campioni prima dell'analisi, è fondamentale per evitare errori nei risultati e nelle interpretazioni, dato che, spesso, i campioni vengono spediti a laboratori distanti dal luogo di prelievo. In condizioni normali, ma soprattutto se il campione deve essere spedito in laboratori lontani, è bene separare il siero o il plasma dalla parte corpuscolata e conservare il campione ad una temperatura di circa 10 °C dato che, sbalzi termici eccessivi e la luce solare, possono influire sulla stabilità del campione, determinando generalmente emolisi.

Alcuni campioni richiedono processazioni speciali o il mantenimento a temperatura di congelamento fino al momento dell'analisi: se si vogliono ottenere risultati attendibili, occorre che la catena del freddo sia rispettata dal momento della raccolta sino alle analisi⁽¹⁴⁾.

3.5 Trasporto al laboratori

L'invio di campioni non adeguati può essere causa di non accettazione da parte dei laboratori. In generale bisogna disporre di un quantitativo adeguato di sangue, che va posto

nella provetta appositamente richiesta dal laboratorio, per quel determinato esame e, come precedentemente citato, bisogna indicare chiaramente sulla provetta i dati identificativi del paziente e la data di campionamento. Insieme al campione va inviato un modulo di richiesta esami, compilato in maniera leggibile in ogni sua parte. I campioni dovrebbero essere inviati al laboratorio per mezzo di un corriere espresso o di un servizio postale efficiente ed arrivare nel più breve tempo possibile, in modo da evitare artefatti da conservazione prolungata. Durante il trasporto, le cellule nella provetta con EDTA possono andare incontro ad apoptosi (morte cellulare programmata) o lisi cellulare; ciò pregiudicherebbe la qualità dello striscio di sangue esaminato dal patologo clinico e potrebbe interferire con l'identificazione delle cellule. Si raccomanda la preparazione e la presentazione di prodotti freschi, essiccati, e strisci di sangue non colorati⁽¹⁴⁾⁽¹⁷⁾. Molti laboratori hanno messo a punto criteri per il rifiuto del campione in modo da minimizzare la probabilità di errore analitico e di refertazione, tra cui vanno ricordati:

- Inadeguata identificazione del campione;
- Campione in cattive condizioni;
- Intensa emolisi;
- Intensa lipemia;
- Grave ittero;
- Campioni destinate a prove microbiologiche raccolti in un mezzo di trasporto non adeguato;
- Campioni molto vecchi.

Un'altra fase importante, in cui si possono avere molti errori, è la registrazione del paziente, durante la quale vengono controllati tutti i parametri di qualità del campione. Minor frequenza di errori ci sarà dove questa parte è automatizzata dalla lettura di un codice a barre delle provette, con il passaggio automatico dei dati sul computer, maggior frequenza di errori sarà presente, invece, per quei laboratori dove tutti i dati sono inseriti manualmente. Nella fase pre-analitica, la maggior parte degli errori nei test biochimici è rappresentata da emolisi, lipemia e ittero tanto che, all'arrivo del campione, i laboratori segnalano la presenza di queste alterazioni, quantificando il grado di alterazione da 1+ a 4+. Quando si sospettano errori preanalitici, possono essere prese alcune semplici misure correttive e ripetere il prelievo potrebbe essere utile⁽¹⁴⁾.

CAPITOLO 4

TECNICHE DI ANALISI IN BIOCHIMICA CLINICA

Nella biochimica clinica veterinaria viene utilizzata un'ampia varietà di tecniche e metodiche che sono state incorporate in diversi strumenti, di cui è necessario conoscere i principi che ne sono alla base. In campo veterinario, c'è stato un notevole incremento di strumenti destinati all'uso ambulatoriale "in clinic", che in accordo alla medicina umana, sono denominati "point of care" o "strumenti al letto del paziente" e perciò, è importante capire come questi strumenti lavorano per identificare i vantaggi e gli svantaggi, le tecniche di laboratorio necessarie per il loro impiego ed eventuali problemi che possono sorgere durante il loro utilizzo⁽¹⁸⁾. I principali sistemi analitici utilizzati in biochimica clinica sono di due tipi: il primo consiste nella determinazione quantitativa di un analita in fase liquida (chimica liquida), l'altro prevede l'utilizzo di reattivi adsorbiti su di una fase solida (chimica secca). Gli analizzatori di chimica secca presentano i vantaggi di richiedere semplici manualità, sia per l'esecuzione degli esami che per la manutenzione e calibrazione. Gli strumenti a chimica liquida hanno bisogno, a fronte di livelli più elevati di precisione ed accuratezza dei risultati, di una maggiore attenzione nelle operazioni di taratura e nelle determinazioni analitiche⁽¹⁾.

4.1 Spettrofotometria

Tra tutte le tecniche esistenti, quella forse più utilizzata è la fotometria o spettrofotometria ad assorbanza, ovvero una metodica analitica in cui la concentrazione della sostanza è misurata dirigendo un raggio di luce attraverso la soluzione contenente la sostanza che deve essere rilevata e misurando, quindi, la quantità di luce che viene assorbita. Per ottenere questa misurazione si usa una lunghezza d'onda che sia assorbita dalla sostanza in esame; tale lunghezza d'onda è determinata esaminando lo spettro di assorbimento della sostanza ed è scelta, in genere, quella in cui si abbia la massima assorbanza. Talvolta, vengono scelte altre lunghezze d'onda per evitare l'interferenza con sostanze come l'emoglobina o la bilirubina, le quali hanno propri spettri di assorbimento e dovrebbero essere evitate lunghezze d'onda che queste sostanze assorbono intensamente. La luce è classificata in base alla lunghezza d'onda ed è misurata in nanometri (nm): la luce con lunghezza d'onda inferiore a 380 nm è definita ultravioletto (UV), la luce nello spettro del visibile ha una lunghezza d'onda da 380 nm a 750 nm, quella con lunghezza d'onda maggiore è definita infrarosso (IR) tra 750 e 2000 nm. Le varie sostanze assorbono e riflettono le lunghezze

d'onda della luce UV o della IR, nel modo tipico di quella sostanza e si dice che la sostanza ha il suo caratteristico spettro⁽¹⁸⁾.

Lo spettrofotometro ad assorbanza è composto da una sorgente di luce, un dispositivo focalizzatore, un monocromatore, una cuvetta e un rivelatore (vedi figura 1).

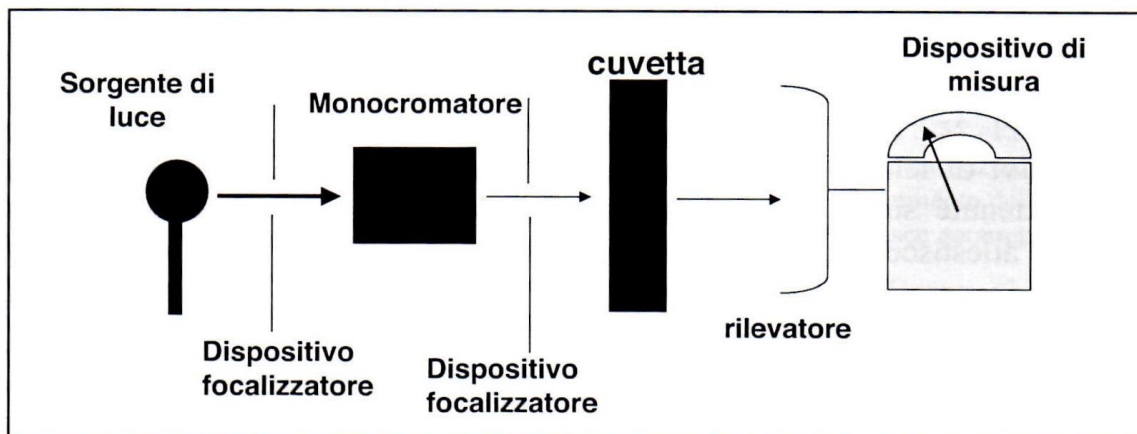


Figura 1 – Schema dello spettrofotometro ad assorbanza ⁽¹⁸⁾

Il monocromatore permette di restringere lo spettro di luce che passa attraverso la cuvetta ed è costituito da filtri, prismi o griglie per produrre un'ampiezza di banda spettrale. I filtri sono composti da un sottile strato di vetro colorato che trasmette la luce alla lunghezza d'onda corrispondente al colore del filtro oppure, a volte, possono essere dei filtri multipli per produrre una luce con più elevata purezza spettrale. I prismi separano le lunghezze d'onda più brevi, deviandole maggiormente rispetto alle lunghezze d'onda più lunghe, in modo da separarle. Le griglie sono invece formate da una piastra di metallo o vetro su cui sono state praticate diverse depressioni.

Il dispositivo di focalizzazione è composto da lenti o fessure inserite prima e dopo il monocromatore e serve per restringere il fascio di luce e produrre fasci paralleli, regolando l'intensità di luce che raggiunge il fotorilevatore.

Le cuvette, note anche con il nome di camere di saggio o celle di assorbimento, a seconda dello strumento cambiano di dimensione, forma e materiale. In esse è posta la soluzione contenente la sostanza di cui si deve misurare la concentrazione, quindi il raggio di luce deve passare attraverso la cuvetta e la soluzione. Una parte del fascio di luce, oltre ad essere assorbito dalla sostanza, è anche assorbito dalla parete della cuvetta e dalla soluzione. Per eliminare l'effetto di questi fattori si deve azzerare lo spettrofotometro facendo passare il

fascio di luce attraverso una cuvetta contenente la sola soluzione in cui la sostanza è sospesa, chiamata “bianco campione”: la lettura di assorbimento di tale campione rappresenta lo zero dello strumento. Solo successivamente può essere misurata la concentrazione della sostanza facendo passare lo stesso fascio di luce attraverso la cuvetta contenente stavolta sia la soluzione sia la sostanza⁽¹⁸⁾.

I fotorilevatori raccolgono i fasci di luce che non sono stati assorbiti dalla sostanza e hanno la capacità di trasformare la luce in corrente elettrica in misura proporzionale alla luce che li colpisce. Tale corrente generata viene poi trasmessa ad un dispositivo di lettura, che a sua volta converte l'informazione in assorbanza o concentrazione della sostanza in esame⁽¹⁸⁾.

Oltre alla strumentazione di base della spettrofotometria di assorbanza, occorre prestare attenzione e comprendere i principi fisico-chimici impiegati nella misurazione attraverso questa tecnologia. Quando un raggio di luce, a specifica lunghezza d'onda, è proiettato verso una soluzione che assorbe quella specifica lunghezza d'onda, la luce assorbita è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza in quella soluzione. L'assorbanza della luce aumenta all'aumentare della concentrazione della sostanza che deve essere misurata e, dal valore dell'assorbanza, può essere calcolata la concentrazione di una sostanza usando la legge di Beer-Lambert:⁽¹⁸⁾

$$A = abc$$

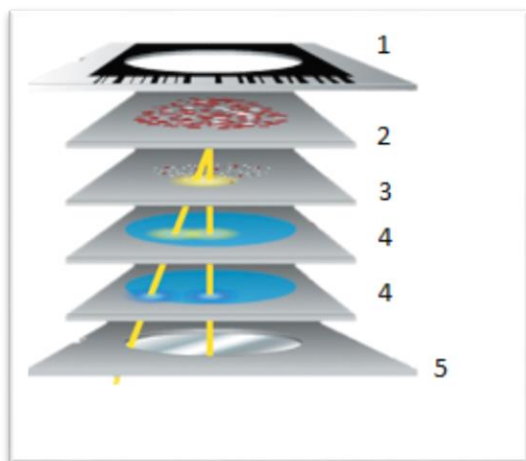
dove A rappresenta l'assorbanza misurata; a l'assorbanza molare anche nota come costante di proporzionalità; b la lunghezza dello spazio che la luce deve attraversare in centimetri; c è la concentrazione della sostanza. Tramite una inversione dei fattori si può calcolare la concentrazione della sostanza:⁽¹⁸⁾

$$c = A/ab$$

Per applicare la legge di Beer-Lambert deve esistere una relazione di linearità tra la concentrazione della sostanza e l'assorbanza. A tale scopo devono essere usate delle soluzioni di calibrazione (calibratori), che contengono le concentrazioni della sostanza che deve essere misurata. Le misurazioni ottenute dai calibratori dovrebbero creare un intervallo in cui rientrano le concentrazioni ottenute dai campioni dei pazienti⁽¹⁸⁾.

Da distinguere dalla fotometria ad assorbanza è la fotometria a riflettanza, il cui principio è utilizzato in alcuni grandi analizzatori di biochimica clinica automatizzati e in diversi analizzatori di biochimica clinica più piccoli. La maggior parte di questi strumenti, come

precedentemente citato, utilizzano un sistema di chimica a secco in cui il fluido che deve essere analizzato, viene posizionato su un trasportatore che contiene i reagenti per il saggio. Questo trasportatore può avere varie forme come un cuscinetto di fibra secca o un film a multistrato (vedi Figura 2):



1. Il campione del paziente viene erogato
2. strato di diffusione: il campione viene distribuito in modo uniforme;
3. strato di reazione;
4. strato indicatore che raccoglie il campione attivato per l'analisi spettrofotometrica,
5. strato di supporto con l'interfaccia ottica

Figura 2 - Rappresentazione di una cartina per chimica a secco utilizzata dal VetTest 8008 ® (Idexx Italia srl).

Dopo l'applicazione del fluido, avviene la reazione chimica sul trasportatore ed il prodotto si forma in una concentrazione proporzionale alla sostanza che deve essere misurata. Quindi, il trasportatore viene illuminato con una luce diffusa e l'intensità della luce riflessa dal trasportatore viene misurata e comparata sia con la luce di illuminazione originale, sia con l'intensità della luce riflessa da una superficie di riferimento⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾. La fotometria di riflettanza è analoga alla fotometria di assorbanza, ovvero la reazione chimica, che avviene nel trasportatore, risulta in un prodotto che assorbe una porzione della luce di illuminazione e la parte di luce che rimane viene riflessa, proprio come nella spettrofotometria ad assorbanza. L'intensità della luce riflessa non è correlata direttamente alla concentrazione della sostanza che viene prodotta e, di fatto, ne consegue che, per convertire la riflettanza in risultati di concentrazione, devono essere impiegate formule speciali, che variano con il tipo di strumento utilizzato⁽¹⁸⁾.

Un analizzatore a chimica secca, il cui principio è simile agli altri strumenti, ma con caratteristiche di funzionamento diverse, è il *Reflowet Plus*® (vedi Figura 3), un sistema di analisi basato sull'utilizzo di strisce reattive, ideale per la gestione delle emergenze diagnostiche ed il monitoraggio dei pazienti⁽²⁰⁾.



Figura 3 - Rappresentazione dello strumento Reflovet Plus® (da www.scilvet.com)

Per eseguire un'analisi è sufficiente posizionare 32 µl di sangue intero, plasma o siero sulla striscia reattiva ed inserirla nell'analizzatore (vedi Figura 4). I risultati, pronti in soli 2 minuti, vengono automaticamente visualizzati su display e stampati tramite la stampante integrata. I parametri che vengono analizzati sono i seguenti: fosfatasi alcalina, amilasi, bilirubina, azoto ureico BUN, creatinfosfochinasi, creatinina, gamma glutamil-transferasi, glucosio, aspartato-aminotransferasi, alanina-aminotransferasi, emoglobina, potassio, trigliceridi, urea, acido urico⁽²⁰⁾.



Figura 4 - Rappresentazione dello strumento Reflovet Plus® (da www.scilvet.com).

4.2 La qualità delle misurazioni e delle tecniche utilizzate

Le qualità metrologiche di un esame di laboratorio sono importanti parametri da prendere in considerazione e comprendono una serie di fattori, che racchiudono i seguenti principi:

- Specificità
- Accuratezza
- Precisione o fedeltà
- Limiti analitici
- Praticabilità
- Robustezza

La *specificità* analitica è la capacità di una tecnica di misurare un singolo costituente o parametro, in una soluzione complessa.

L'*accuratezza* è la capacità di un test di misurare, in modo corretto, il vero valore di un parametro nel campione; il vero valore è, di solito, predeterminato con un metodo analitico indicato, a volte, con il nome di “standard aureo” della misurazione per quel dato parametro.

La *precisione* o *fedeltà* indica la capacità del metodo di analisi di riprodurre in modo costante e prevedibile un certo risultato, quando il materiale da utilizzare per le analisi viene prelevato dallo stesso campione. Preciso è il metodo in cui esiste solo una piccola varianza tra i risultati ottenuti dopo ripetute analisi. La *deviazione standard (SD)* di un gruppo di misurazioni è la radice quadrata della *varianza* e la precisione di un test viene descritta in base al *coefficiente della varianza (CV)*, il quale viene calcolato dividendo la deviazione standard per la media (il valore medio di ripetute misurazioni) e moltiplicando il risultato per 100, in modo da ottenere il coefficiente percentuale della varianza. A questo concetto, si affiancano altri due termini: *ripetibilità*, ovvero la precisione intrasaggio che si basa su misure consecutive entro la stessa serie (stessi reagenti, stesso strumento, stesso personale ecc.); *riproducibilità* indica la precisione intrasaggio che si basa su misure effettuate cambiando una o più condizioni (modifica del metodo di misurazione, sostituzione dell'operatore e dello strumento di misura, ecc.)⁽²¹⁾.

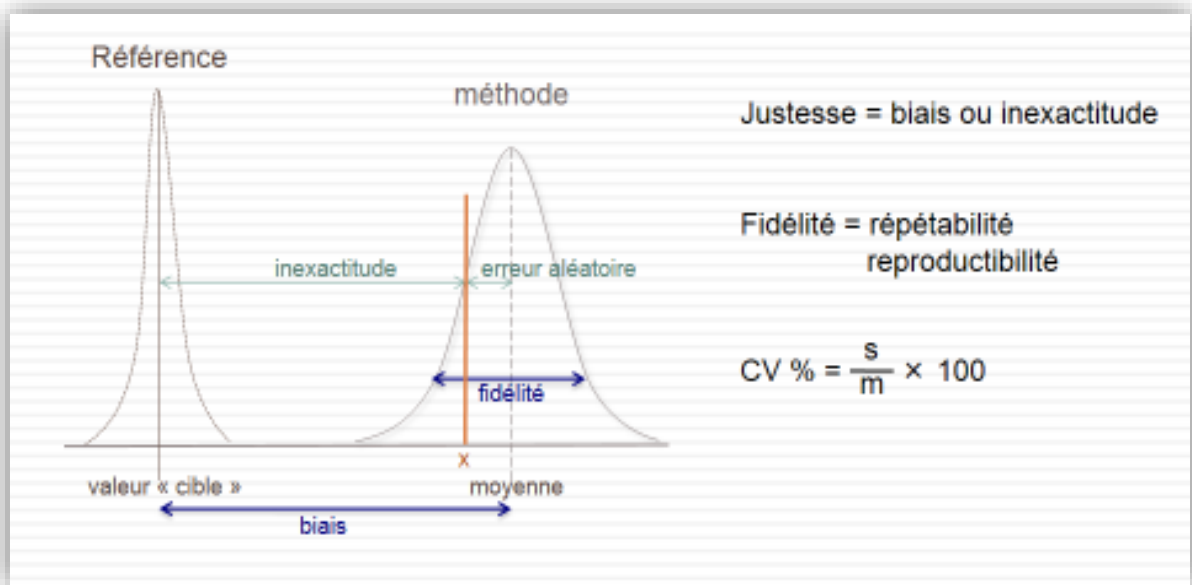


Figura 5 - Rappresentazione delle variazioni analitiche, da Caratteristiche di un metodo di analisi. (Berder C, Prélèvements sanguins en médecine et sciences des animaux de laboratoire : influence et gestion des facteurs de variation, LDHVet, École Vétérinaire Oniris-Nantes, 2013).

Il *limite analitico* è la capacità di un test di rilevare, con precisione, piccole quantità del parametro ricercato e, in ambito diagnostico, deve rivelare in modo affidabile piccole quantità della sostanza ricercata. Ha due caratteristiche: il *limite di linearità*, ovvero il limite massimo di misurazione per una serie di dati di laboratorio ottenuti da uno strumento e da un metodo di analisi che ha valutato una serie di campioni con l'analisi progressivamente in aumento; il *limite di misurazione*, cioè il limite minimo di misurazione per una serie di dati di laboratorio ottenuti da uno strumento e da un metodo di analisi che ha valutato una serie di campioni con l'analisi in progressiva diminuzione⁽²¹⁾. Tra le altre qualità metrologiche vanno ricordate la *praticabilità*, la quale indica tutto ciò che rende la tecnica semplice da eseguire, con limitata capacità tecnica, rapidamente disponibile, a basso costo, attendibile e sicura; la *robustezza*, cioè l'abilità nel fornire risultati accettabili nonostante le modificazioni della tecnica⁽²¹⁾.

CAPITOLO 5

L'EMOLISI

Il termine emolisi deriva dal greco haimo (cioè, sangue) e lysis (cioè, scioglimento) e definisce il processo patologico caratterizzato dal danneggiamento della membrana dei globuli rossi del sangue con conseguente liberazione di emoglobina ed altri componenti intracellulari nel liquido che li contiene (in genere il sangue). L'emolisi è un fenomeno importante in medicina per almeno due ragioni: in primo luogo, l'emolisi in vivo, causata da una varietà di condizioni e patologie, può portare a diversi gradi di anemia, in secondo luogo, l'emolisi in vitro, che è invece causata da procedure inadeguate di raccolta e trattamento del campione biologico, può inficiare l'attendibilità dei risultati di molti esami di laboratorio ed influire negativamente sulla diagnosi e cura dei pazienti. Oggettivamente, la presenza e la quantificazione dell'emolisi è valutabile mediante la determinazione dell'emoglobina libera nel plasma. Studi effettuati in medicina umana hanno dimostrato che piccole quantità di emoglobina sono sempre rilevabili nel plasma o nel siero ed il limite superiore di riferimento dell'emoglobina plasmatica e sierica è rispettivamente 0,02 e 0,05 g/L (è generalmente più alta nel siero a seguito del processo fisiologico di coagulazione del campione, che determina la lisi di un piccolo numero di emazie e minore con i campioni raccolti in anticoagulante); in medicina veterinaria non sono presenti studi tanto accurati. Il fenomeno emolitico, generalmente, non si osserva nel sangue in toto, ma diventa visibile quando si separa il plasma o il siero dagli RBC e se la quantità di emoglobina supera gli 0,02 g/dl ⁽²²⁾ ⁽²⁴⁾.

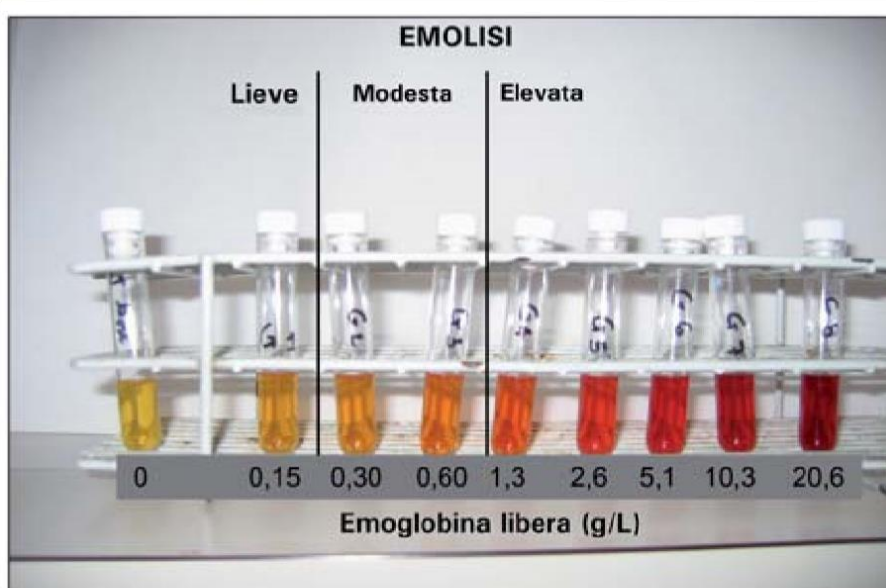


Figura 6 – Scala di emolisi nei campioni biologici ⁽²²⁾.

La facilità di emolisi è inversamente proporzionale alle dimensioni, alla costituzione della membrana dell'eritrocita e alla Resistenza osmotica eritrocitaria (ROE). L'eritrocita canino normale, il cui volume è 70 fl, è il più resistente, mentre l'eritrocita della capra, che misura 20 fl, è il più fragile. La ROE indica la capacità dell'eritrocita di resistere alla rottura, con conseguente emolisi, in una soluzione salina di NaCl progressivamente ipotonica: la concentrazione di soluzione salina che dà inizio al processo emolitico è detta ROE minima, mentre la concentrazione di soluzione salina alla quale il processo è totale è detta ROE massima⁽²³⁾.

5.1 Cause che portano alla formazione di emolisi

Le patologie che possono causare anemia emolitica sono imputabili ad una aumentata distruzione degli RBC, che può essere extravascolare (prematura distruzione da parte dei macrofagi, in particolare quelli della milza e del fegato) o, meno comunemente, intravascolare (rottura della membrana eritrocitaria in circolo). La presentazione clinica dell'anemia emolitica dipende da vari fattori, tra i quali l'entità e la velocità di distruzione degli RBC in circolo. Malgrado i sintomi siano simili ad altre forme di anemia (ad es., stanchezza, pallore, dispnea), nell'emolisi acuta il quadro clinico è importante, con tachicardia e ipotensione e serio rischio per la vita del paziente. Nei pazienti con emolisi modesta l'anemia può essere invece completamente asintomatica. La rottura degli RBC in circolo determina comunque segni caratteristici come ittero e talora emoglobinuria⁽²²⁾.

Le cause che invece possono determinare emolisi in vitro si estendono lungo tutta la filiera che porta il campione all'analisi:

- origine traumatica e meccanica diretta sugli eritrociti per eccessiva suzione nel prelevare il sangue in una siringa con una ago di piccolo diametro, travaso del sangue dalla siringa alla provetta tramite l'ago con notevole pressione, uso di provette sotto vuoto di volume eccessivo rispetto al calibro del vaso e alla quantità di sangue da prelevare, eccessiva stasi venosa durante il prelievo, eccessiva pressione negativa applicata sul sangue già presente nella siringa quando si cerca di riposizionare l'ago in una vena da poco persa, eccessiva agitazione di sangue nei contenitori per mescolarlo con l'anticoagulante, congelamento anche parziale del sangue, centrifugazione ad alta velocità o per un tempo troppo lungo, surriscaldamento del sangue;

- ritardo dell'invio del campione al laboratorio: se non è possibile inviarlo entro breve tempo, sarebbe opportuno conservarlo in frigorifero ad una temperatura compresa tra +4°/+10° C e separare il siero o il plasma prima dell'invio al laboratorio;
- contatto con soluzioni ipotoniche/chimiche per effetto osmotico, per contatto con l'acqua della siringa, ago o contenitore, uso di alcool, etere o disinfettanti vari;
- lipemia: tale alterazione determina un aumento della fragilità eritrocitaria per le variazioni elettriche che induce sulla composizione lipidica della membrana eritrocitaria, di fatto, uno stesso campione può essere sia lipemico sia emolitico. ⁽²³⁾

Attraverso uno studio in medicina umana, è stato indagato se la forza di aspirazione determinata dal volume di riempimento della provetta fosse correlata alla comparsa dell'emolisi e se, l'uso di provette a minore volume di aspirazione, potesse ridurre l'entità del problema. Tra i fattori principali e determinanti da prendere in considerazione rientra il tipo di dispositivo utilizzato, in modo particolare il catetere intravenoso, comunemente chiamato agocannula, molto utilizzato in medicina d'urgenza. È costituito da un sistema metallico a mandrino che permette la puntura della cute e della vena, per poi essere ritratto, lasciando all'interno del vaso stesso solamente un tubicino flessibile. Questo consente qualche movimento al braccio senza il rischio di rottura della vena, provoca minore fastidio al paziente durante il periodo di infusione e permette un maggior tempo di permanenza del dispositivo in sede. La disponibilità di un accesso venoso, già posto in sede, spinge molti operatori a utilizzare questa via anche per il prelievo di sangue, tuttavia, è uno strumento per infusione, che può causare emolisi del campione di sangue a causa del traumatismo nel posizionamento, del collabimento dei margini dell'agocannula durante l'aspirazione, del liquido di lubrificazione del mandrino, del traumatismo determinato dal percorso non lineare del fluido e della presenza di valvole di non ritorno, che ne ottimizzano l'impiego a scopo infusionale⁽²⁵⁾.

Per lo studio sono stati utilizzati volumi residui di due campioni di sangue prelevati a scopo diagnostico a 1000 soggetti, presso il dipartimento di emergenza dell'ospedale San Bortolo di Vicenza. Un campione è stato raccolto in provetta 13x100 mm, con litio eparina e gel separatore, con volume di aspirazione di 5,0 ml (Vacuette, Greiner Bio-One, codice 456083); il secondo campione è stato raccolto in provetta 13x75 mm, con anticoagulante e gel separatore identici, ma con volume di aspirazione di 2,5 ml (Vacuette, codice 454046). Il dispositivo di prelievo è stato in tutti i casi l'agocannula da 18 G (Insyte Autoguard, BD

Medical Systems). Nessuna indicazione riguardante la sequenza di prelievo è stata data agli infermieri addetti al prelievo. Il grado di emolisi nei campioni è stato determinato con tecnica spettrofotometrica, attraverso la determinazione dell'indice di siero relativo all'emolisi (HI) su analizzatore automatico Advia 2400 (Siemens Healthcare Diagnostics) ⁽²⁵⁾. Gli indici di siero sono espressi in valori quali-quantitativi privi di unità di misura, non danno stime quantitative di concentrazione, non hanno alcun significato diagnostico ma segnalano le caratteristiche e permettono la tracciabilità dell'adeguatezza del campione, in fase di validazione dei risultati⁽¹³⁾. Su un totale di 798 campioni, 48 (6%) presentavano un HI >150 quando il prelievo era eseguito nella provetta da 5 ml; l'HI nella provetta da 2,5 ml superava il valore di 150 solo in sei casi, con una riduzione della percentuale dei campioni da rigettare da 6% a 0,8%. In tre dei 48 campioni, l'HI era superiore nel secondo campione, mentre negli altri era più basso, mediamente, del 86% (intervallo, 44÷98). Questo lavoro ha preso in considerazione una provetta da 2,5 ml, volume ampiamente sufficiente per l'esecuzione di un pannello esteso di esami, comprensivo di esami biochimici e marcatori cardiaci e di flogosi. Oltre alla valutazione di una minore forza di aspirazione, questa sperimentazione ha misurato in modo oggettivo l'emolisi, mediante stima del HI e utilizzato un cut-off predefinito per stabilire l'accettabilità o meno del campione⁽²⁵⁾. La randomizzazione dell'ordine di prelievo, l'esecuzione contemporanea del prelievo delle due provette da parte dello stesso operatore, con lo stesso dispositivo e la stessa tipologia di anticoagulante su ciascun paziente, consentono di escludere altri errori sistematici nel determinismo dell'emolisi, riconoscendo come unica causa della differenza di emolisi la differenza di pressione di aspirazione. Nei 798 campioni studiati è stata rilevata una percentuale di emolisi del 6%, valore che sostanzialmente conferma la percentuale attesa sulla base della media annua dei campioni emolisati provenienti dal pronto soccorso (6,5%). La provetta ad aspirazione minore ha determinato una riduzione dell'emolisi in 45 dei 48 campioni risultati emolizzati nella provetta da 5 ml. Solamente tre campioni hanno mostrato un comportamento inverso, con un livello di emolisi maggiore nella provetta ad aspirazione minore. La percentuale di campioni emolisati con l'utilizzo della provetta da 2,5 ml è risultata dello 0,8%, nettamente al di sotto del 2%, definito come buona pratica clinica dalla Società Americana di Patologia Clinica, anche se tale percentuale non tiene conto degli altri fattori che in pratica possono contribuire all'emolisi del campione. Esiste, verosimilmente una sinergia tra le diverse cause di emolisi: l'azione correttiva su una di esse può determinare un miglioramento anche di altre cause concatenate. In questo studio è stato quindi, dimostrato che la forza di aspirazione delle provette sotto vuoto è un fattore critico dell'emolisi prodotta

dal prelievo con agocannula. L'uso di provette ad aspirazione ridotta (2,5 ml) diminuisce drasticamente il fenomeno dell'emolisi associata all'uso dell'agocannula⁽²⁵⁾.

5.2 Metodiche per determinare la concentrazione di emoglobina

L'emoglobina è un parametro eritrocitario molto importante, la cui determinazione è soggetta ad un certo margine di errore (+/- 5%), anche con il metodo della conversione in metaemoglobina, universalmente adattato. Di seguito, verranno descritte le tecniche principali per determinare la sua concentrazione⁽²⁴⁾.

Fotocolorimetrica alla cianometaemoglobina: si basa sul principio che il ferrocianuro converte il ferro emoglobinico dallo stato ferroso al ferrico per formare meta-Hgb in una soluzione alcalina e quindi, si combina con il cianuro di potassio per dare origine al pigmento cianometa-Hgb stabile. Viene utilizzato un fotometro che ha una lunghezza d'onda di 540 nm, per il quale occorre avere a disposizione un campione in bianco per l'azzeramento del fotometro. Sarebbe opportuno inoltre, stabilire una retta di taratura con una soluzione di Hgb standard diluita a varie concentrazioni, infatti il valore del campione in esame in Densità Ottica deve essere riportato su questa retta di taratura, per ottenere il valore in g/dl. I moderni strumenti e reagenti non prevedono la costruzione di tale retta perché sono metodiche già auto calibrate⁽²⁴⁾.

La metodica comporta un errore massimo del +/- 5% e misura tutte le forme di Hgb, esclusa la solfo-Hgb. Si possono verificare errori nella determinazione di Hgb nel sangue lipemico o nel sangue di gatto per la presenza di numerosi corpi eritrocitari rifrangenti⁽²⁴⁾.

Fotocolorimetrica con formazione di metaemoglobina: il principio di tale reazione si basa sulla formazione dei sali di ammonio quaternario, contenuti nella soluzione lisante, che, a causa del loro potenziale tensioattivo, danneggiano la membrana eritrocitaria con conseguente rilascio di emoglobina. Successivamente, i sali di ammonio si legano alla globina dell'emoglobina libera, determinando la conversione dell'emoglobina a metaemoglobina attraverso l'ossidazione del ferro dell'eme dallo stato Ferroso (Fe 2+) allo stato Ferrico (Fe 3+). Il cromogeno che si forma viene analizzato con un metodo colorimetrico a 540 nm⁽²⁴⁾.

Emoglobinometri portatili: ne esistono due modelli, grazie ai quali può essere determinata l'emoglobina anche dalle strutture meno attrezzate dal punto di vista del laboratorio. Il primo modello è il "Hb Meter" (Leica), che prevede l'assorbimento di luce verde da parte dell'Hgb

rispetto all'assorbimento di vetri standard colorati: si pone una goccia di sangue in una cuvetta di vetro riusabile e quindi si emolizza con l'agitazione attraverso un applicatore impregnato di un agente emolitico. La cuvetta viene riposta nell'emoglobinometro ed i risultati sono ottenuti mediante la comparazione visiva della luce verde trasmessa dal sangue del paziente con quello dei vetri colorati standard. Il secondo modello è il "HemoCue", per il quale si impiegano 10 mL di sangue intero che vengono aspirati per capillarità in un tubicino al cui interno è contenuto il reagente. La micro-cuvetta viene posta all'interno dello strumento ed i valori di assorbimento sono letti a lunghezze d'onda pari a 565 nm e 880 nm; quest'ultima misura viene impiegata per compensare qualsiasi torbidità del campione in esame⁽²⁴⁾.

5.3 Cause di variazione nella concentrazione di emoglobina

La concentrazione dell'Hgb può aumentare per una serie di cause, che vengono riportate di seguito:

- disidratazione, che può derivare da un'eccessiva perdita di acqua o da una diminuita introduzione di acqua;
- paura ed apprensione: durante queste due condizioni si ha un aumento di adrenalina, più pronunciata nelle specie nevrili (gatto, cavallo purosangue), con conseguente contrazione splenica e aumento, a carattere transitorio di ematocrito, emoglobina e numero di eritrociti;
- shock: in questa sindrome si ha una contrazione splenica e spostamento di liquidi verso gli organi viscerali;
- lavoro muscolare prolungato, in cui si ha contrazione splenica adrenalinica;
- policitemia, condizione caratterizzata da un aumento oltre il normale dei globuli rossi circolanti, Hgb ed ematocrito; può essere transitoria, relativa ed assoluta;
- da artefatti, come evaporazione del campione di sangue mal conservato, lipemia ed un incremento di corpi di Heinz (artefatti che rendono più elevata la lettura del campione di sangue con indagine spettrofotometrica) ⁽²⁴⁾.

Allo stesso modo, si può assistere ad una diminuzione della concentrazione di emoglobina in condizioni di anemia; nella tarda gravidanza in cui la concentrazione di Hgb decade per tutto il periodo fino al suo apice minimo fino al momento del parto; sedazione farmacologica

in cui c'è deposito o sequestro di eritrociti dalla circolazione alla milza; da artefatti, come la diluizione degli RBC per un campionamento errato oppure la presenza di coaguli⁽²⁴⁾.

5.4 Interferenza dell'emolisi sui risultati delle analisi

La presenza di emolisi nei campioni biologici riflette un processo più generale di danneggiamento delle cellule ematiche e che coinvolge, pertanto, globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Il conseguente rilascio in circolo di molecole, proteine ed enzimi intracellulari può generare effetti importanti e indesiderati sull'attendibilità di alcuni esami di laboratorio. L'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) fornisce una chiara definizione di interferenza analitica, che è "errore di misurazione sistematico causato da un componente presente nel campione che di per se non dovrebbe produrre un segnale nel sistema di misura". Selby ha fornito però un'altra definizione, forse anche più idonea e razionale in questo specifico contesto, e cioè "effetto di una sostanza presente in un sistema analitico che causa la deviazione del valore misurato dal valore vero"⁽²²⁾. L'emolisi induce una serie di effetti sugli esami di laboratorio poiché i componenti chimici del sangue, come ad esempio Na o K, sono spesso presenti in diverse concentrazioni nel plasma e nei globuli rossi, perciò, se la concentrazione di una sostanza è più elevata negli eritrociti rispetto al plasma, l'emolisi determina un falso aumento di tali costituenti, al contrario, se la concentrazione negli eritrociti è minore rispetto al plasma, l'emolisi darà un effetto diluitore. Questi cambiamenti variano secondo la specie o la razza e sono indipendenti dall'analizzatore e dalla tecnica impiegata. Inoltre l'emolisi, rilasciando emoglobina libera, determina un'interferenza colorimetrica nelle indagini spettrofotometriche comprese in una lunghezza d'onda tra 300 e 500 nm e una variazione della torbidità del campione⁽²³⁾.

*Analiti alterati a causa del rilascio dagli eritrociti:
dipendenti dalla specie e dalla razza*

Aspartato aminotransferasi
Creatinichinasi
Lattato deidrogenasi
Fosforo
Potassio*

*Analiti alterati a causa di un'interferenza con il dosaggio:
dipendenti dall'analizzatore o dalla metodologia utilizzata*

Alanina aminotransferasi
Albumina
Fosfatasi alcalina
Amilasi
Aspartato aminotransferasi
Calcio
Cloro
Colesterolo
Creatinichinasi
Creatinina
Glucosio
Lipasi
Bilirubina totale
Proteine totali

*Alterato solo nelle razze con elevate concentrazioni eritrocitarie di potassio. Non dovrebbe essere alterato nella maggior parte dei cani e dei gatti.

Tabella 1- Effetti dell'emolisi sugli esami clinici ⁽²⁷⁾.

L'emolisi determina una diminuzione dell'ematocrito e nel numero dei globuli rossi, mentre il valore dell'Hgb resta invariato; gli indici MCHC e MCH risultano falsamente aumentati, così come si nota un aumento marcato di LDH ed AST a causa del rilascio di sostanze dagli eritrociti. Nei test spettrofotometrici, si ha un aumento della lipasi sierica, di urea, fosforo inorganico, proteine totali refrattometriche e una diminuzione di bilirubina, creatinina e calcio. Molto spesso, è preferito l'utilizzo del siero rispetto al plasma per molte analisi chimiche a causa di eventuali interferenze dovute ai vari anticoagulanti⁽²³⁾. Nel corso degli ultimi anni sono stati prodotti numerosi studi in campo umano, volti a definire l'interferenza dell'emolisi sugli esami di laboratorio. L'eterogeneità nel disegno degli studi, delle piattaforme analitiche e soprattutto delle diverse tecniche analitiche non consente di produrre un quadro d'insieme univoco, poiché i differenti metodi possono essere più o meno sensibili all'interferenza. Dovrebbe essere compito specifico dei produttori di kit diagnostici definire con accuratezza gli effetti dell'emolisi sulla determinazione dei vari analiti ed il personale di laboratorio dovrebbe, successivamente, verificare contro quale "target" è stata valutata l'accettabilità dell'interferenza⁽²²⁾.

Uno studio ha visto coinvolti sedici volontari sani e la creazione di quattro livelli di emolisi in base alle concentrazioni di emoglobina, che sono stati divisi in cinque gruppi: Gruppo I: 0-0,10 g/L, gruppo II: 10-0,50 g/L, Gruppo III: 0,51-1,00 g/L, Gruppo IV: 1,01-2,50 g/L, Gruppo V: 2,51-4,50 g/L. La lisi eritrocitaria è stata ottenuta mediante traumi meccanici. I risultati sono stati analizzati per verificare se l'emolisi sia leggera, lieve, moderata abbia avuto un impatto significativo sulle concentrazioni di alcuni analiti, che sono stati misurati con un analizzatore Olympus (Olympus AU2700 system reagent, Olympus Diagnostica Lismeehan, Ireland) ⁽²¹⁾. Gli effetti dell'emolisi sono state valutate sulla base delle norme di tolleranza del Clinical Laboratory Improvement (CLIA'88), in cui vengono stabiliti i limiti per il metodo e le prestazioni di laboratorio, per valutare specifici analiti regolamentati. In pratica, l'errore totale accettabile per un dato metodo analitico deve essere inferiore ai rispettivi limiti fissati dal CLIA per quel determinato analita⁽²¹⁾.

Dai risultati emersi si può comprendere che l'emolisi influenza la concentrazione plasmatica di tutta una serie di parametri biochimici, tra i quali l'effetto più importante si osserva per aspartato-aminotrasferasi (AST), lattato-deidrogenasi (LD), potassio e bilirubina totale. Per gli altri analiti: albumina, fosfatasi alcalina (ALP), amilasi, cloruro, creatininfosfochinasi (CK), colesterolo, glucosio, magnesio, proteine totali, trigliceridi e acido urico, le differenze sono statisticamente significative, ma i valori sono rimasti entro i limiti CLIA. Poiché la conoscenza dei possibili effetti è importante per una corretta interpretazione dei risultati, lo scopo di questo studio era quello di valutare gli effetti di interferenza dell'emolisi su test biochimici comunemente usati, i cui risultati possono aiutare a prevenire il rigetto inutile di campioni⁽²²⁾.

5.5 Azioni correttive per limitare l'emolisi

L'emolisi in vitro rappresenta un problema significativo per il laboratorio clinico, anche perché è identificabile solo dopo che il campione ha subito il processo di centrifugazione, con separazione di siero o plasma dagli elementi corpuscolati del sangue. Ciò è ovviamente possibile in laboratori che dispongano di sistemi "aperti" (strumentazione preanalitica separata da quella analitica), ma è virtualmente impossibile in laboratori che utilizzino sistemi "chiusi", in cui la strumentazione di preanalitica è in serie ("in catena") con quella analitica. Contestualmente, la rilevazione di emolisi è virtualmente impossibile nei campioni di sangue intero (ad es., campione per esame emocromocitometrico o velocità di eritrosedimentazione). In quest'ultima circostanza, l'unica possibilità d'identificazione del

problema, rappresentata dalla centrifugazione sistematica di tutti i campioni dopo l'analisi, presenta considerevoli problemi di natura organizzativa e soprattutto di attendibilità clinica, qualora si rendesse necessario risospendere e rianalizzare il campione dopo che è stato centrifugato. Sulla base di tali premesse, l'identificazione dei campioni emolisati appare essenziale, poiché l'emolisi potrebbe sottendere o riflettere patologie gravi responsabili o associate ad anemia emolitica che richiedono un'urgente notifica ai clinici, oppure alcuni esami su campioni emolisati in vitro potrebbero determinare risultati inattendibili, che non riflettono la condizione in vivo⁽²²⁾. Tradizionalmente, i campioni emolisati sono stati identificati arbitrariamente, mediante ispezione visiva del campione da parte del personale del laboratorio. Nonostante la quantificazione dell'emoglobina libera nel siero o nel plasma sia teoricamente possibile utilizzando saggi immunonefelometrici, l'utilizzo di questo approccio di routine su tutti i campioni è poco pratico⁽²²⁾.

In medicina umana, come precedentemente citato, l'interferenza può essere misurata spettrofotometricamente da sistemi analitici di biochimica di ultima generazione, denominati "indici di siero". Questa modalità oggettiva di rilevare gli interferenti permette la creazione di regole, anche automatiche, per la valutazione dell'idoneità del campione e della successiva validazione di dati accurati. In letteratura si trovano diverse proposte di algoritmi per la correzione dei dati analitici in presenza di interferenti rilevati dagli "indici di siero", che sono rivolti prevalentemente all'emolisi. Non è ancora stato raggiunto un consenso univoco in merito all'utilizzo delle formule correttive; la soluzione proposta è di identificare i test maggiormente influenzati dall'emolisi, sulla base della metodica utilizzata, non refertare il dato ma dare segnalazione con commento qualitativo e quantitativo, e comunicare al clinico il dato con richiesta contestuale di un campione di controllo per escludere l'ipotesi di emolisi in vivo⁽¹³⁾.

L'emolisi in vitro, può essere minimizzata nei seguenti modi:

- ✓ usare aghi affilati per prelevare il sangue;
- ✓ evitare un eccesso di pressione negativa durante il prelievo;
- ✓ dopo il prelievo, agitare delicatamente il sangue nella provetta e maneggiarla con cura;
- ✓ utilizzare adeguate tecniche di centrifugazione per separare il plasma o il siero dal resto delle cellule;
- ✓ evitare il surriscaldamento ed il congelamento dei campioni;

✓ assicurare che non vi sia umidità nel campione⁽²⁷⁾.

Oltre all'emolisi, le altre sostanze cromofore connesse a patologie e che interferiscono con alcuni metodi o danno letture di assorbanza errate, pregiudicando la qualità e l'accettabilità del campione sono la lipemia e l'ittero, che verranno trattate successivamente⁽¹³⁾.

CAPITOLO 6

LA LIPEMIA

Il termine lipemia descrive l'aspetto di sangue, siero o plasma contenente livelli di trigliceridi eccessivamente elevati. Si tratta di una manifestazione evidente che accompagna spesso l'iperchilomicronemia, ovvero il disordine del metabolismo lipidico riscontrato con maggiore frequenza negli animali da compagnia. Il termine *iperlipemia* si riferisce a un disturbo del metabolismo lipidico che provoca un innalzamento dei livelli sierici dei grassi, in particolare trigliceridi (TG) e/o colesterolo. In condizioni di digiuno, l'iperlipemia è un reperto di laboratorio anomalo, indice di sintesi accelerata o ritardata degradazione delle lipoproteine. Nel cane e nel gatto, la forma di iperlipemia più comune e di maggiore rilevanza clinica è caratterizzata da livelli sierici di trigliceridi eccessivamente elevati, una condizione definibile come *ipertrigliceridemia*: il siero e il plasma degli animali colpiti assumono un tipico aspetto torbido lattescente (vedi Figura 7) ⁽²⁸⁾.

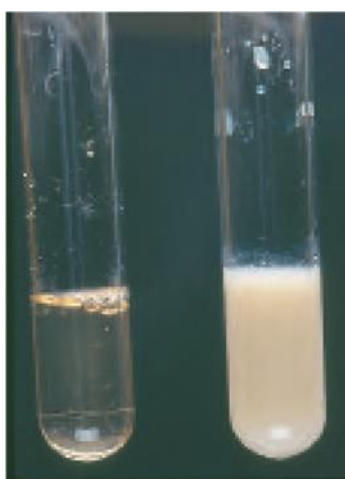


Figura 7- Aspetto del siero normale e lipemico ⁽²⁹⁾.

Sul piano clinico, il riscontro di siero lipemico pone due importanti ordini di difficoltà: in primo luogo, la condizione interferisce (in senso positivo o negativo) con le analisi quantitative dei componenti sierici; in secondo luogo, la lipemia può indurre processi patologici significativi, tali da mettere in pericolo la vita del soggetto ⁽²⁸⁾.

6.1 Cause di lipemia

La causa di lipemia più comune è il tempo insufficiente che intercorre tra il prelievo di sangue ed il pasto. Nel cane o nel gatto, valori di trigliceridemia a digiuno superiori a 1000 mg/dl giustificano un intervento terapeutico e un tentativo di abbassare tali livelli al di sotto

di 500 mg/dl. Nei soggetti a digiuno, la lipemia denota lo stato di ipertrigliceridemia associato alla ritenzione di lipoproteine a bassissima densità e/o di chilomicroni. In queste due specie, i chilomicroni normalmente compaiono nel siero da 30 minuti a 1 ora dopo l'ingestione di un pasto contenente grassi. Questa situazione è associata a un innalzamento transitorio (da 6 a 10 ore) dei livelli sierici di trigliceridi, che quindi ritornano rapidamente entro i valori di base. L'ipotesi di iperlipemia fisiologica o iperlipidemia postprandiale può essere esclusa facilmente se il soggetto è stato tenuto a digiuno nel corso delle 12 ore precedenti il prelievo del campione. Negli animali normali, l'intorbidamento post-prandiale del siero è accompagnato da un leggero innalzamento della trigliceridemia (da 150 a 400 mg/dl) che rientra tipicamente nella normalità entro 10 ore⁽²⁸⁾.

L'iperlipemia può, inoltre, essere la conseguenza di anomalie lipidiche secondarie a numerose altre condizioni (Tabella 2). Quelle che esitano in un'iperlipemia secondaria comprendono ipotiroidismo, pancreatite, colestasi, iperadrenocorticismo, diabete mellito, sindrome nefrosica, obesità e consumo di diete molto ricche di grassi. Queste condizioni devono essere studiate ed escluse come potenziali cause di iperlipemia prima di prendere in considerazione l'ipotesi che quest'ultima sia di natura primaria⁽²⁹⁾.

Postprandiale
Primaria
Iperlipoproteinemia idiopatica
Ipercolesterolemia idiopatica
Iperchilomicronemia idiopatica
Secondaria
Ipotiroidismo
Diabete mellito
Pancreatite
Colestasi
Sindrome nefrosica
Iperadrenocorticismo
Diete ad elevato tenore di grassi
Obesità

Tabella 2 – Cause di iperlipemia nel cane ⁽²⁹⁾.

Una volta accertato che l'iperlipemia si verifica dopo un digiuno di 10-12 ore ed aver escluso tutte le possibili cause di una forma secondaria, si può formulare un sospetto diagnostico di

iperlipemia primaria. Queste condizioni sono di solito determinate geneticamente. Nel cane, sono stati osservati parecchi tipi differenti di iperlipemia primaria, come la iperchilomicronemia idiopatica, la ipercolesterolemia idiopatica e la iperlipoproteinemia idiopatica; tuttavia, le loro eziologie non sono state ben accertate. È probabile che, con ulteriori ricerche, sia possibile identificare sia nel cane che nell'uomo molte sindromi primarie differenti con sottili variazioni nell'eziologia⁽²⁹⁾.

6.2 Interferenza della lipemia sui risultati delle analisi

L'accumulo di lipoproteine nel campione del paziente può interferire con gli analiti misurati, sia per interazioni fisiche sia chimiche. Questo è particolarmente importante nei metodi elettroforetici, così come in vari saggi immunologici: le lipoproteine possono interferire con la reazione antigene-anticorpo bloccando i siti di legame degli anticorpi e, ciò può accadere anche quando gli anticorpi sono legati ad una superficie solida. A seconda della natura della reazione, l'interferenza può causare risultati falsamente aumentati e/o falsamente diminuiti.

I metodi spettrofotometrici restano, comunque, i più colpiti dall'interferenza lipemica: le lipoproteine sono in grado di assorbire la luce, la cui quantità è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda e diminuisce da 300 a 700 nm, senza particolari picchi di assorbimento fra i due valori, pertanto, i metodi che usano lunghezze d'onda inferiori sono più colpiti dalla lipemia⁽³⁰⁾.

Il campione lipemico determina un falso aumento di proteine plasmatiche totali, albumina, glucosio, bilirubina, calcio, fosforo, emoglobina e porta invece ad una riduzione di sodio e potassio⁽²⁴⁾.

6.3 Azioni correttive per limitare la lipemia

Nella maggior parte dei casi, la lipemia può essere rimossa dal campione e la misurazione può essere realizzata in un campione chiaro senza interferenze. Ci sono diversi modi per rimuovere i lipidi, e gli esperti di laboratorio devono scegliere attentamente quale utilizzare a seconda delle misure che devono essere effettuate nel campione.

Per ottenere un siero o un plasma con cui poter effettuare un profilo biochimico, il sangue deve essere centrifugato. Dopo centrifugazione, le particelle sono distribuite secondo la loro densità: i chilomicroni e le particelle VLDL hanno una bassa densità e saranno, pertanto, situate nella parte superiore del tubo, formando uno strato distinto. I costituenti del plasma si distribuiscono in strati a seconda della loro polarità: gli analiti idrofobici sono distribuiti

nella fase lipidica e quindi saranno sospesi in superficie, gli analiti solubili nella fase acquosa (piccole molecole, elettroliti) saranno presenti nella parte inferiore del tubo. Quando si prelevano campioni per le varie misurazioni, la maggior parte degli analizzatori ottiene il campione dalla parte superiore del tubo, utilizzando sensori per evitare che l'ago vada troppo in profondità. Questo approccio è, dunque, non accettabile per la misura di ormoni, farmaci e altre sostanze idrofobiche, poiché saranno distribuiti nello strato lipidico, e la misura del campione sottostante causerà un risultato falsamente diminuito⁽³⁰⁾. I campioni con iperlipidemia possono essere trattati con LipoClear® (prodotto da StatSpin, USA) per chiarificare il siero, rimuovere i lipidi e riprocessando il surnatante per i test che danno segnalazione di interferenza⁽¹³⁾.

CAPITOLO 7

L'ITTERO

Il termine ittero definisce la colorazione giallastra di cute e mucose per elevata concentrazione di bilirubina nel sangue, rilevata nel siero/plasma quando la bilirubina $> 0,6$ mg/dL e clinicamente evidente quando supera 1,5-2,0 mg/dL. La quantificazione, alla sola ispezione visiva del campione centrifugato, può non essere attendibile e si raccomanda, quindi, di utilizzare una rilevazione fotometrica, mediante lettura a 450 e 575 nm⁽³¹⁾ ⁽³²⁾.



Figura 8 – Campione itterico (Laboratorio Nantes-Oniris)

7.1 Cause di ittero

In linea generale, l'ittero riconosce due fattori causali che agiscono singolarmente o in combinazione:

1. sovrapproduzione di bilirubina (malattie emolitiche);
2. difettosa escrezione di bilirubina (colestasi da difetto di captazione o di coniugazione della bilirubina non coniugata; colestasi da incapacità meccanica di escrezione della bilirubina coniugata).

Dal punto di vista patogenetico possono risultare tre tipi di ittero: emolitico, epatocellulare/epatotossico, ostruttivo (da stasi)⁽³³⁾.

7.2 Interferenza dell'ittero sui risultati delle analisi.

La bilirubina è il prodotto finale della ripartizione dell'eme e rappresenta il pigmento biliare più cospicuo, responsabile del suo colore caratteristico. Nel sangue si individuano tre frazioni di bilirubina: la bilirubina indiretta (complessata all'albumina), la bilirubina diretta (complessata all'acido glucuronico) e la bilirubina delta (bilirubina diretta complessata all'albumina)⁽³⁴⁾. (Figura 9)

Elevate concentrazioni di bilirubina interferiscono sui risultati delle analisi di laboratorio, in parte per le proprietà spettrali della bilirubina stessa, e in parte per la sua capacità di reagire chimicamente con alcuni reagenti. La bilirubina reagisce con reazioni catalizzate dall'enzima perossidasi, utilizzate nei sistemi di rilevazione di glucosio, colesterolo e acido urico. Provoca inoltre, un'interferenza negativa con il metodo enzimatico per la determinazione della creatinina⁽³⁵⁾.

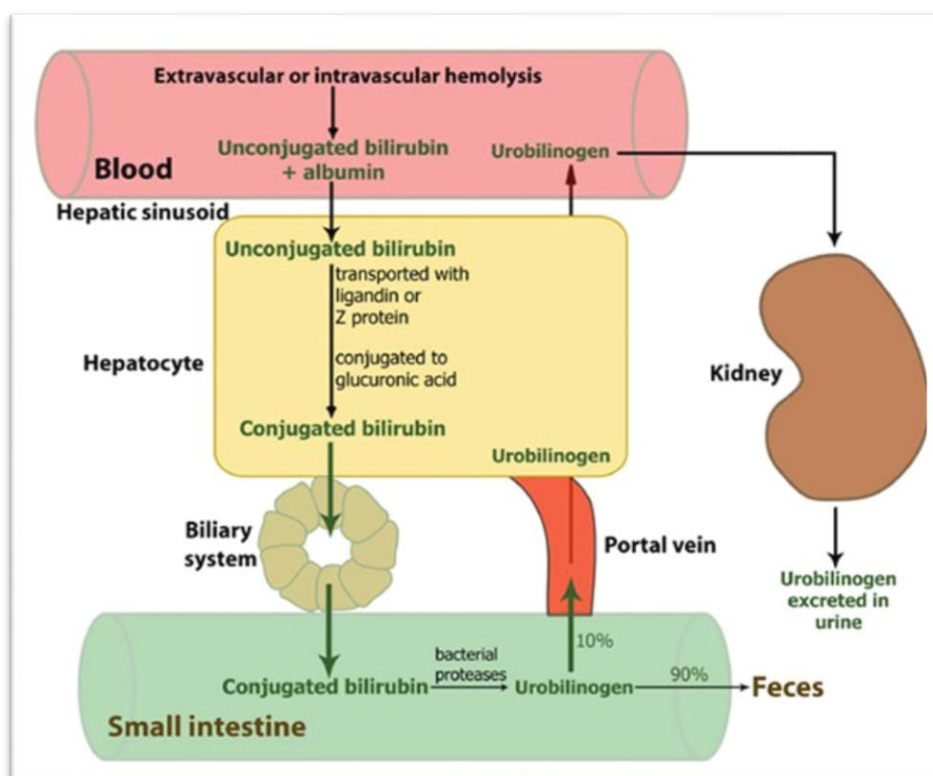


Figura 9 – Metabolismo della bilirubina.⁽³⁶⁾

CAPITOLO 8

ALTRI ERRORI PREANALITICI

8.1 Campioni inadeguati in Ematologia e Coagulazione

In campo umano così come in campo veterinario, le cause di non accettabilità del campione in ematologia e coagulazione riguardano prevalentemente campioni coagulati, con insufficiente quantità di sangue (rapporto anticoagulante e sangue non rispettato), o campioni diluiti per contaminazione con infusioni. Parte di queste cause possono essere evidenziate prima dell'analisi del campione: il campione coagulato può essere segnalato in fase preanalitica attraverso l'esame visivo della provetta, capovolta lentamente, al fine di mettere in evidenza gli eventuali microcoaguli. Anche il campione insufficiente può essere valutato visivamente: l'alterato rapporto anticoagulante/sangue influisce in modo significativo sui test della coagulazione (anticoagulante citrato di sodio) con variazioni dei risultati di Tempo di Protrombina (PT) e Tempo di Tromboplastina Parziale attivato (aPTT), causandone un aumento, mentre in ematologia (anticoagulante K2/K3-EDTA) comporta modificazioni osmotiche che influiscono sulle caratteristiche morfologiche dei leucociti.

I test della coagulazione risentono della temperatura e del tempo di processazione: il campione conservato a 4°C avrà un valore basso di PT, risulterà stabile per 48 ore se ben conservato a temperatura ambiente, mentre l'aPTT dovrà essere determinato, preferibilmente, tra le 2 - 4 ore dal prelievo. Per gli esami di ematologia e coagulazione, il corretto utilizzo delle provette viene agevolato dalla distinzione per colore, che corrisponde al contenuto in anticoagulante e concentrazione predeterminata di EDTA, di potassio e citrato di sodio, che comporta livelli minimi di rifiuto del campione per le analisi ⁽¹³⁾.

- *Procedura di gestione dei campioni non idonei per volume insufficiente*: il laboratorio dovrebbe specificare dettagliatamente, nell'ambito delle procedure operative, il volume minimo richiesto per completare l'analisi e la prassi da seguire per gestire questo specifico problema. Il volume minimo richiesto per la determinazione varia in relazione al numero di analisi richieste ed alle relative procedure analitiche. Inoltre, il laboratorio dovrebbe provvedere a richiedere un secondo campione con volume idoneo; se ciò non fosse possibile, si raccomanda di sostituire al valore dell'analita un commento codificato nel referto (ad esempio "Analisi non eseguibile per campione insufficiente"). Questa raccomandazione

assume assoluto rilievo per esami in cui sia essenziale un corretto rapporto tra concentrazione di anticoagulante e sangue, come gli esami emocoagulativi⁽³¹⁾.

- *Procedura di gestione dei campioni non idonei per presenza di coaguli*: la presenza di coaguli all'interno di campioni di sangue influenza il risultato degli esami emocromocitometrici ed emocoagulativi a seguito del consumo di piastrine, fattori della coagulazione ed incorporazione di elementi corpuscolati del sangue nei coaguli. A parte qualche eccezione, la maggior parte dei risultati di analisi eseguite su campioni di siero o plasma inopportunaemente coagulati non risultano clinicamente modificate. In presenza di campioni coagulati destinati ad analisi emocoagulative ed emocromocitometriche, gli esami non devono essere eseguiti ed il laboratorio dovrebbe richiedere un secondo campione. Se ciò non fosse possibile, si raccomanda di sostituire al valore dell'analita un commento codificato nel referto (ad esempio "Analisi non eseguibile per campione coagulato")⁽³¹⁾.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 9

La parte sperimentale della seguenti tesi si articola in due principali sezioni di studio riguardanti i campioni emolitici, lipemici ed itterici di cane e gatto, analizzati nei due laboratori universitari di Patologia Clinica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa e dell'École Vétérinaire Oniris di Nantes. La prima sezione documenta la prevalenza dei campioni alterati, analizzati nei due laboratori in un periodo di 3 anni e verifica l'esistenza di un'associazione tra la quantità della sostanza interferente (colesterolo, trigliceridi e bilirubina) e la stima visiva osservata dall'operatore, per i campioni lipemici ed itterici di Pisa. La seconda sezione riguarda uno studio prospettico effettuato nel laboratorio di Oniris di Nantes. In un periodo di circa 3 mesi, sono stati dosati emoglobina, colesterolo, trigliceridi e bilirubina, rispettivamente di campioni emolitici, lipemici ed itterici al fine di verificare l'esistenza di un'associazione tra il dosaggio dell'analita e la stima visiva osservata dall'operatore. Inoltre, è stato possibile effettuare una comparazione tra i risultati di albumina, fosfatasi alcalina, alanina aminotransferasi, colesterolo, trigliceridi, proteine totali, urea e creatinina misurati prima e dopo la centrifugazione a 4°C dei campioni lipemici, al fine di verificare se esistono differenze statisticamente significative.

Nello specifico, gli obiettivi di questa tesi sono stati i seguenti:

- prevalenza e studio comparativo dei campioni emolitici, lipemici ed itterici stimati dagli operatori tecnici nei due laboratori: studio retrospettivo,
- azioni intraprese per limitare gli effetti dei campioni emolitici, lipemici ed itterici,
- valutazione di emolisi, ittero e lipemia tramite quantificazione spettrofotometrica di emoglobina, bilirubina, colesterolo e trigliceridi: studio prospettico,
- valutazione statistica di alcuni analiti (albumina, fosfatasi alcalina, alanina aminotransferasi, creatinina, urea, colesterolo, trigliceridi, proteine totali) in campioni lipemici pre e post-centrifugazione a 4°C: studio prospettico,
- proposte di standardizzazione della stima semi-quantitativa di emolisi, lipemia ed ittero da parte degli operatori tecnici.

CAPITOLO 10

MATERIALI E METODI

10.1 MATERIALI

10.1.1 Strumenti

10.1.1.1 Sede di Pisa

Il profilo biochimico, presso il laboratorio di Patologia Clinica Veterinaria (ODV, UdP), viene eseguito tramite lo strumento “Lyasis” (vedi Figura 10) fornito dalla ditta Assel® (Roma). Lyasis è un analizzatore da banco automatico a caricamento continuo per analisi cliniche di tipo chimico. E’ controllato da un computer ed ha un suo specifico software di funzionamento⁽³⁷⁾.



Figura 10- Rappresentazione dello strumento Lyasis® (da Manuale Operativo Lyasis).

Esegue un principio di lettura fotometrica in cui avvengono reazioni End Point, Cinetiche, Fixed Time ma anche differenziali e bicromatiche, utilizzando una lunghezza d’onda che va dai 340 nm ai 620 nm. E’ composto delle seguenti parti: ⁽³⁷⁾

- un vano laterale contenente le soluzioni di lavaggio (acqua distillata, Rinse e Clean) utilizzate per eliminare contaminazioni crociate e pulire lo strumento all’inizio e al termine di ogni ciclo di funzionamento
- Uno sportello frontale da cui si accede a 9 cassette refrigerate di caricamento di cui:
 - il 1° cassetto composto da 14 posizioni per controlli e calibratori;
 - il 2°,3°,4° cassetto composti da 33 + 2 posizioni per i reattivi;
 - 5 cassette per il caricamento continuo dei campioni suddivisi a loro volta in:

a) 4 cassette da 16 posizioni a caricamento continuo, grazie ai quali è possibile inserire nuovi campioni da elaborare in carrelli diversi da quello in cui lo strumento sta lavorando;

b) 1 cassetto da 14 posizioni per esami in urgenza: qualora servissero risultati tempestivi lo strumento, anche se è in funzione, termina l'elaborazione del campione in corso e si sposta sui nuovi campioni disposti su questo carrello.

- Un piatto di reazione termostato a 37°C, contenente 60 cuvette in plastica fornite dalla ditta, in ognuna delle quali avverrà la reazione della soluzione (reagente + campione) per arrivare alla lettura della concentrazione della sostanza. Ogni cuvetta è lavabile, riutilizzabile e rimovibile singolarmente, qualora per un difetto, dovesse essere sostituita prima delle altre.
- Una stazione di lavaggio, che provvede al lavaggio di ogni cuvetta.
- Un braccio di campionamento che aspira la quantità richiesta sia di reagente sia di campione e li miscela all'interno della cuvetta.

Un computer con il software del sistema che permette la visualizzazione dei dati elaborati e numerose altre funzioni⁽³⁷⁾.

Nel laboratorio è presente un sistema automatico che si interfaccia con il computer dello strumento per la ricezione dei dati dall'accettazione e la trasmissione finale dei dati elaborati nel sistema informatico della gestione della struttura denominato OCIROE.

Lo strumento Lysis offre notevoli vantaggi rispetto agli apparecchi manuali SLIM (SEAC®), utilizzati precedentemente nel laboratorio. Permette, infatti, di avere una produttività di 200 test/ora con un tempo di esecuzione analitica che va dai 48" ai 756" a seconda della metodica richiesta, utilizzando un quantitativo sia di campione che di reagente nettamente inferiore agli strumenti completamente manuali. Necessita di un volume di reazione compreso tra i 300 µl e i 670 µl per i reagenti e dai 3 µl ai 30 µl per i campioni, mentre per gli apparecchi SLIM sono necessari dai 500 µl ai 1000µl di reagenti e dai 10 µl ai 100 µl di campioni. La differenza più importante tra i due strumenti consiste proprio nell'intervento dell'operatore sugli apparecchi manuali SLIM, che prepara manualmente la quantità sia di reagente che di campione, al contrario dello strumento Lysis, che grazie alla sua automatizzazione, riduce la variabilità dell'operatore⁽³⁷⁾.

Il computer, ad esso collegato, presenta sulla schermata principale un'interfaccia utente che ripresenta graficamente lo strumento. Come si può vedere dalla figura 11, sulla sinistra si

trovano i pulsanti dei comandi e dei vari menù a tendina del programma; al centro sono rappresentati i cassetti di caricamento dei controlli, calibratori, reagenti e campioni; a destra il piatto di reazione e in basso nella zona grigia, quando l'apparecchio è in funzione, è presente l'area di visualizzazione dati dove compaiono i risultati dei campioni processati⁽³⁷⁾.

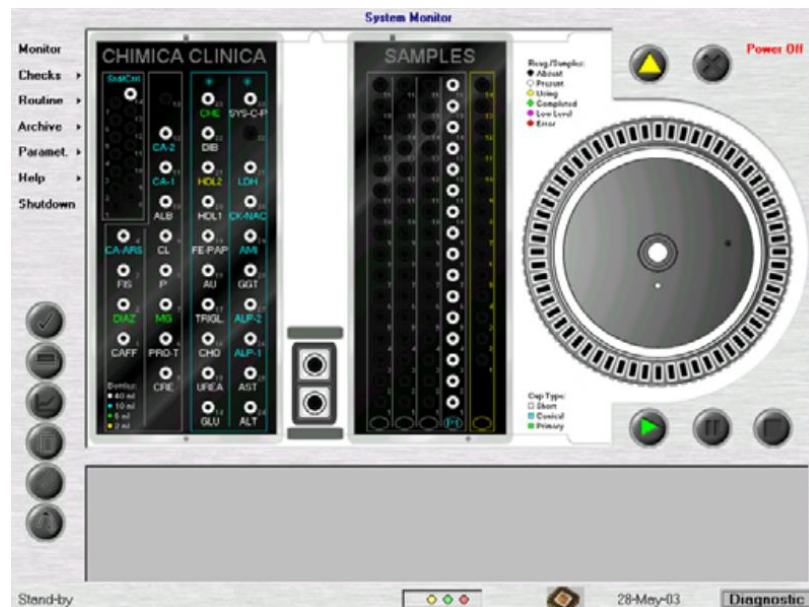


Figura 11- Interfaccia utente (da Manuale Operativo Lysis).

10.1.1.2 Sede di Nantes

Nel laboratorio dell'ospedale veterinario dell'École Oniris di Nantes, il profilo biochimico è eseguito grazie allo strumento "RX daytona" (vedi figura 12) della ditta Randox Laboratories®, produttrice di prodotti per la clinica diagnostica in Irlanda e Regno Unito, espansa in tutto il mondo⁽³⁸⁾.



Figura 12-Rappresentazione dello strumento RX daytona® (da Manuale operativo RX daytona).

RX daytona è un analizzatore per la chimica liquida, a lettura fotometrica, completamente automatizzato, ideale per laboratori di piccola-medio resa, dotato di un proprio software di funzionamento.

Ha una capacità di esecuzione di 180 tests fotometrici e 270 tests con modulo ISE, per un totale di 450 tests/ora; esecuzione di metodiche UV e colorimetriche con reazioni End-Point, Cinetiche, monocromatiche e bicromatiche, utilizzando una lunghezza d'onda compresa tra i 340 nm ed i 700nm.

È dotato di un lettore barcode che permette l'identificazione di campioni e reagenti muniti di etichetta con codice a barre⁽³⁹⁾.

E' composto delle seguenti parti:

- uno sportello frontale da cui si accede ad un piatto muovibile con 40 posizioni per i reagenti refrigerati (20 posizioni per flaconi da 100, 50 o 20 ml e 20 posizioni solo per i flaconi da 20 ml), identificati attraverso il codice a barre; la temperatura di raffreddamento dei reagenti è compresa tra 8°-15° C; è dotato di un sistema di allerta in caso di reagente insufficiente, obsoleto o inadeguato (vedi figura 13);
- micropipette per i reagenti con sensore del livello del liquido e di protezione contro gli shocks termici;
- un secondo piatto muovibile con 40 posizioni per i campioni ed i calibratori di diverse dimensioni (da 12 a 16 mm di diametro e da 55 a 100 mm di altezza), con un volume di 100 µl;
- micropipette per i campioni con sensore del livello di liquido, analogo a quello per i reagenti;
- un doppio sistema di agitazione a tre velocità;
- 45 cuvette permanenti in Pirex, riutilizzabili, della durata di cinque anni, la cui capacità volumetrica va da un minimo di 180 µl ad un massimo di 500 µl; il sistema di lavaggio delle cuvette avviene in 20 secondi; (vedi figura 14);
- un'unità ISE integrata al sistema.



Figura 13- Dettagli dello strumento Rx daytona® (da Manuale operativo Rx daytona).

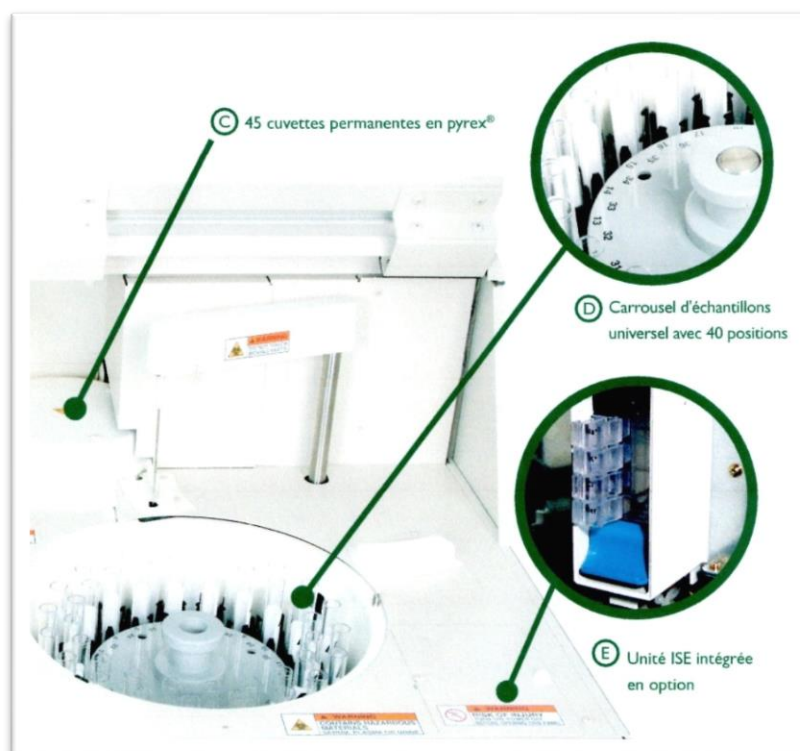


Figura 14- Dettagli dello strumento Rx daytona® (da Manuale operativo Rx daytona).

Lo strumento è dotato di un software compatibile con Microsoft Windows ed il computer ad esso collegato presenta, sulla schermata principale, un'interfaccia utente che raffigura graficamente lo strumento⁽³⁹⁾ (vedi figura 15).

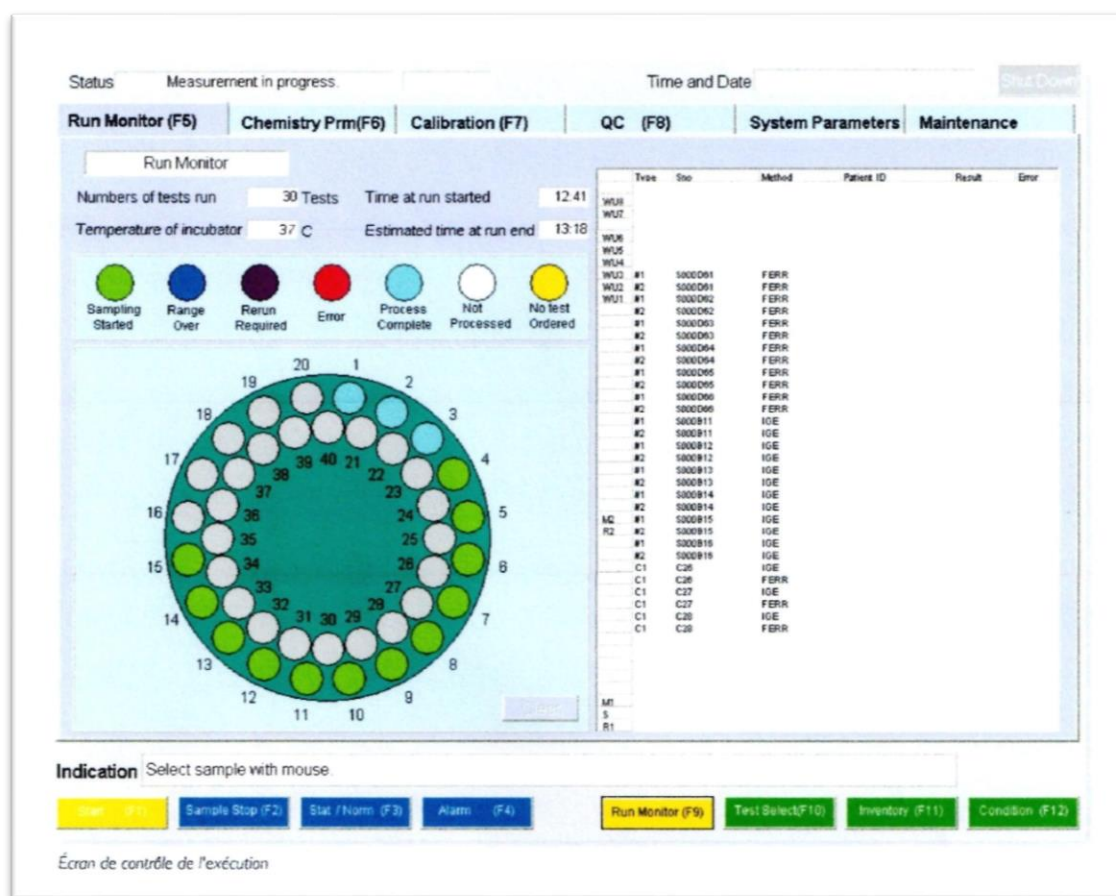


Figura 15-Schermata per il controllo dell'esecuzione (da Manuale operativo Rx daytona).

Le operazioni principali possono essere comandate dalla schermata principale grazie ai seguenti tabs informativi del software, che come si può vedere dalla figura 15, si trovano in alto, riuniti in una specie di barra di applicazione:

- schermata per i parametri del sistema;
- schermata per il controllo qualità;
- schermata per i parametri chimici: carica fino ad 8 profili e definisce l'ordine delle analisi;
- schermata per il mantenimento: il ciclo quotidiano dura meno di 5 minuti;
- schermata per i risultati: scarica i risultati e li stampa;
- schermata per la taratura: regola la diluizione in serie del calibratore creando le curve di calibrazione.

A sinistra della figura 15, è rappresentato il piatto di reazione con le 40 posizioni numerate, munito di una legenda a colori, ai quali corrisponde lo stato del campione in reazione: il colore verde indica l'inizio del processo, l'azzurro la fine del processo, il rosso indica che è

in corso un errore, il bianco è indice di un campione non processato. A destra della schermata, è presente l'area di visualizzazione dei dati, dove compaiono i risultati dei campioni processati⁽³⁹⁾.

Questo strumento offre tests estremamente precisi grazie ad un sistema automatico che riduce i rischi di contaminazione tra reagenti e calcola automaticamente il loro volume residuo e il numero dei tests ancora disponibili, ottimizza i tempi di lavoro del personale, riduce i tempi di arresto grazie alla funzione di ripresa automatica dei campioni limitando il rischio di errore umano.

Nel laboratorio è presente un secondo strumento per la chimica liquida, il Reflovet Plus[®], descritto nel capitolo 4 paragrafo 1, utilizzato soprattutto dagli studenti per le emergenze e dai tecnici di laboratorio per campioni fortemente lipemici, in quanto lavora secondo il principio della fotometria a riflettanza e la lipemia dovrebbe avere un'incidenza minore sui risultati dei tests.

Lo strumento Beckman DU 520 (vedi figura 16), presente nel laboratorio di Oniris Nantes, appartiene ai modelli DU della serie 500: sono strumenti spettrofotometrici UV/visibili completi, capaci di effettuare delle scansioni spettrali a lunghezze d'onda comprese tra 190 e 1100 nm. Sono dotati di un porta-cuvette standard, capace di ricevere 6 cuvette di 1 cm⁽⁴⁰⁾.



Figura 16- Rappresentazione dello strumento Beckman DU 520[®] (foto del laboratorio Oniris di Nantes). In questo laboratorio, è stato utilizzato per la misurazione della quantità di emoglobina presente in campioni emolitici.

È costituito da un monitor-display a cristalli liquidi, una tastiera alfanumerica, un modulo con una cella a sei posizioni di 1 cm; contiene 100 programmi di validazione delle

prestazioni che garantiscono piena funzionalità al sistema, il quale memorizza i dati e consente di rivederli, stamparli ed inviarli tramite l'interfaccia RS-232; è dotato di un software multilingua.

Il sistema DU serie 500 consente di esaminare lunghezze d'onda singole o multiple in assorbanza; le letture di assorbanza dei campioni possono essere direttamente convertite in concentrazioni semplicemente inserendo il fattore e/o i fattori appropriati.

10.2 METODI

10.2.1 Metodiche dal campionamento alla validazione dei risultati del profilo biochimico della sede di Pisa.

Il campione d'elezione per il profilo biochimico è il siero o il plasma con litio eparina.

I campioni vengono portati in accettazione al laboratorio, accompagnati dal modulo di richiesta per gli esami, indicando anche la data di richiesta, il nome del proprietario, il veterinario curante e i dati dell'animale (nome, specie, razza, sesso ed età).

I dati vengono inseriti nel software "Ociroe" che li trasferisce automaticamente ad un computer del laboratorio, collegato con quello dell'accettazione. In questa fase il software assegna al paziente un codice che lo seguirà fino all'ottenimento di tutti i risultati. Il campione è pronto per essere trattato:

- il sangue da cui si otterrà il siero è lasciato in bagnomaria per circa 10 minuti, in modo da facilitare la coagulazione, dopodiché viene centrifugato a 2000 g (3500 rpm per la centrifuga del laboratorio PCV) per 5 minuti;
- il litio eparina viene direttamente centrifugato a 2000 g (3500 rpm) per 5 minuti.

Dopo la centrifugazione, si controlla se i campioni sono lipemici, itterici o emolitici e nel qual caso, l'operatore segnala il grado di alterazione con i seguenti simboli: "+/-", "+", "++", "+++", "++++", in base al grado di stima visiva osservata. In questo laboratorio, i campioni fortemente emolitici, lipemici ed itterici (con alterazione +++ o +++) non vengono analizzati e nel caso sia presente un'alterazione accettabile, vengono effettuate diluizioni con soluzione fisiologica o acqua di 1:2 o 1:3 per l'analita influenzato dall'alterazione, affinché lo strumento legga il campione.

A questo punto, il campione è pronto per essere inserito e processato.

Il software dello strumento Lyasis ci permette di vedere quali pozzetti sono occupati e di conseguenza, scegliere, in base alle disponibilità, la postazione dove poter collocare il nuovo campione. Il campione viene inserito nella cuvetta indicante il codice del paziente e inserito sulla postazione scelta. Avviata l'esecuzione, il braccio di campionamento provvederà a miscelare reagenti e campioni nelle cuvette di reazione. Una volta terminata la lettura da parte dello strumento, il personale del laboratorio controlla i risultati ottenuti. In caso di risultati alterati, si controlla il grafico di reazione, che mostra le densità ottiche ottenute e i tempi di lettura previsti in metodica per il risultato selezionato. Si controlla che il FIT della curva sia intorno a 1 per poter definire una lettura corretta, ed escludere che l'alterazione del risultato sia dovuta allo strumento anziché al soggetto stesso. Il FIT indica lo scostamento dei punti di lettura rispetto alla retta di regressione calcolata ed entro il quale la reazione è ritenuta lineare. Nel caso in cui la lettura non sia corretta, o il campione debba essere diluito, si procederà alla diluizione e riletture del campione. Accettati i risultati vengono stampati e nuovamente trasferiti con il procedimento inverso, descritto precedentemente, su "Ociroe".

10.2.2 Metodiche per il controllo di qualità

Al fine di garantire una migliore qualità dei risultati, gli operatori del laboratorio effettuano il controllo qualità sullo strumento.

Tutti i giorni, all'inizio di ogni ciclo di funzionamento, vengono eseguiti i "controlli", ovvero, vengono inseriti dei campioni a titolazione nota, che la ditta fornisce insieme ai reagenti e agli intervalli, entro cui deve rientrare la lettura di quel campione. Questi controlli sono sieri liofilizzati, che vengono ricostituiti con un volume di acqua distillata indicato sulla confezione, con all'interno concentrazioni determinate di ogni analita. Se i risultati di tali controlli rientrano negli intervalli forniti, ho la sicurezza che le letture effettuate, saranno delle letture corrette dal punto di vista tecnico.

Un'altra procedura effettuata quotidianamente è il controllo di opacità delle cuvette di reazione, essendo la trasparenza alla base per il principio fotometrico. Un apposito comando riporta graficamente lo stato delle cuvette, attraverso la lettura del fotometro che rileva l'intensità di luce uscente dalla cuvetta, mediante fotodiodi che forniscono dati in counts, che non sono altro che la trasformazione digitale del dato analogico in millivolt, rilevato dai fotodiodi. Il range di tolleranza per le cuvette va dai 28000 ai 63000 counts⁽³⁷⁾. Ad ogni seduta analitica viene eseguito il lavaggio di tutte le cuvette.

Una volta a settimana, generalmente il lunedì quando si cambiano i reagenti, viene effettuata la calibrazione, che deve garantire la funzionalità dello strumento per l'intera settimana. Il calibratore è un campione di siero liofilizzato da ricostituire con la quantità di acqua indicata in etichetta, ottenendo così una concentrazione nota di analiti. La calibrazione ha una stabilità di circa 7 giorni e viene effettuata per tutti gli analiti ad eccezione degli enzimi, i cui fattori di moltiplicazione sono già forniti dalla ditta e preimpostati quindi nello strumento.

Una volta al mese o in caso di necessità, viene osservata la curva di qualità dei controlli per ogni analita, in cui si riportano graficamente i valori dei controlli giornalieri e si osserva il loro andamento mensile.

10.2.3 Raccolta retrospettiva dei dati

I dati della prima sezione di studio sono stati raccolti dal programma File Maker[®], attraverso l'estrazione con parole chiave (emolisi, lipemia ed ittero) e, successivamente, elaborati con il programma Microsoft Excel[®]. In un periodo di 3 anni (dal 1/10/2010 al 1/10/2013), sono stati analizzati 234 campioni emolitici, 230 campioni lipemici e 45 campioni con alterazioni combinate (lipemia + emolisi), 183 campioni itterici e 6 campioni con alterazioni combinate (ittero + lipemia), rispettivamente di cane e gatto. In tutti i campioni alterati è indicata la stima visiva osservata dall'operatore, con i simboli "+/-", "+", "++", "+++", "++++".

Dai 230 campioni lipemici sono stati selezionati due gruppi di campioni per specie (191 campioni di cane e 39 campioni di gatto), che presentavano rispettivamente, il dosaggio di trigliceridi e colesterolo, includendo nei lipemici il gruppo di campioni lipemici ed emolitici, dato che l'emolisi è secondaria alla presenza della lipemia; non sono stati considerati i campioni lipemici senza la quantificazione di colesterolo e trigliceridi. Lo stesso procedimento è stato applicato ai 183 campioni itterici: è stato creato un gruppo di campioni itterici con il rispettivo dosaggio della bilirubina totale per specie (93 campioni di cane e 53 campioni di gatto). Non sono stati considerati i 37 campioni senza la quantificazione della bilirubina, né i campioni con l'alterazione combinata lipemia-ittero, poiché molto pochi.

10.2.4. Metodiche dal campionamento alla validazione dei risultati del profilo biochimico della sede di Nantes.

Il laboratorio Oniris di Nantes analizza sia i campioni dell'ospedale didattico, sia i campioni che gli arrivano da altre cliniche e/o ambulatori esterni all'École. Quest'ultimi arrivano per corriere, entro le 24 ore dal prelievo, all'interno di contenitori a temperatura ambiente o

congelati e, prima di essere analizzati, vengono di nuovo centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti. I campioni interni invece, vengono subito analizzati e possono essere, o conservati in frigorifero tra i 3°-7° C per circa una settimana o congelati, nel caso in cui sia necessario effettuare dosaggi sperimentali. Il plasma nella provetta in litio eparina e il siero sono i substrati d'elezione per il profilo biochimico.

Tutti i campioni sono accompagnati da appositi moduli di richiesta, divisi per specie, in cui si indica la data, il n° di laboratorio (apposto con un timbro) che seguirà il campione fino ai risultati finali, il reparto, il veterinario referente ed i dati dell'animale (nome, specie, razza, sesso ed età). I dati vengono inseriti nel software "Clovis", che permette la consultazione dei risultati finali del veterinario referente.

Il campione viene centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti, dopodiché si controlla la presenza di emolisi, lipemia ed iperbilirubinemia e l'operatore segnala il grado visivo di alterazione osservato, con i seguenti simboli: "+/-", "+", "++", "+++", "++++"; il laboratorio analizza tutti i campioni alterati, qualsiasi sia la concentrazione delle sostanze interferenti; non sono accettati i campioni coagulati.

A questo punto, il campione è pronto per essere processato.

La schermata principale dello strumento RX Daytona, permette di vedere quali posizioni sono occupate e di conseguenza, scegliere la postazione dove poter collocare il nuovo campione. Una volta estratto il piatto di reazione (vedi figura 17), il campione viene inserito nell'apposita posizione, indicante il codice del paziente e inserito sulla postazione scelta. Avviata l'esecuzione, le micropipette automatiche (vedi figura 18) provvedono a miscelare reagenti e campioni. Una volta terminata la lettura, lo strumento stampa i risultati: in caso di risultati alterati, la schermata iniziale segnala l'errore ed in caso di necessità, viene rilanciato il campione per una nuova analisi. I risultati stampati vengono inseriti e validati, manualmente, dall'operatore nel programma "Clovis", al fine di poter essere consultati.



Figura 17- Piatto mobile di reazione di Rx daytona® (foto del laboratorio Oniris di Nantes)



Figura 18- Micropipette automatiche miscelanti di Rx daytona® (foto del laboratorio Oniris di Nantes).

Come già precedentemente citato, i campioni fortemente lipemici vengono analizzati dallo strumento Reflovet Plus®. Si ritira una striscia reattiva dal flacone delle analisi che ci interessano, richiudendolo immediatamente, per proteggere le altre strisce reattive dall'umidità e dall'aria; si apre l'involucro di alluminio in cui si trova la striscia e la andiamo a posizionare sul bordo dello strumento per immobilizzarla, si prelevano 32µl di plasma o siero con la pipetta Reflotron, evitando la formazione di bolle di aria e si deposita la goccia sulla striscia, in corrispondenza del piccolo quadrato rosso, mantenendola in posizione

orizzontale la inseriamo nello strumento e si chiude il coperchio. I risultati appaiono sul display dello strumento in due secondi, vengono stampati e riportati manualmente sul programma “Clovis”, dall’operatore.

Per il dosaggio dell’emoglobina con lo strumento Beckman 520, si utilizzano 6 cuvette trasparenti al cui interno vengono depositati 2,5ml di reagente e 10µl di campione, dopodiché si miscelano accuratamente con le rispettive micropipette e si mettono al riparo dalla luce per 20 minuti. A questo punto, sono pronte per essere inserite nello strumento ed analizzate; i risultati compaiono in 2 secondi sulla schermata, pronti per essere stampati.

10.2.4.1 Metodiche per il controllo di qualità

Il laboratorio Oniris di Nantes effettua tre tipi di controllo qualità sullo strumento RX daytona:

- ogni giorno, vengono preparati tre campioni controllo a tasso basso, medio ed alto per ogni sostanza: i risultati delle analisi dei sieri di controllo devono corrispondere ai risultati previsti ed inclusi in essi. I valori ottenuti vengono riportati su un registro;
- una volta a settimana, viene effettuata la calibrazione sistematica di ogni parametro; per creatinina ed urea viene fatto due volte a settimana, perché più sensibili;
- una volta al mese, viene effettuato un controllo qualità esterno, chiamato “Riquas” secondo il programma fornito dalla ditta Randox®: ogni due settimane viene passato un campione di controllo (fornito dalla ditta) nello strumento per tutti i parametri ed i risultati vengono inviati, via web, al centro “Riquas”. Questo controllo mette a confronto i risultati ottenuti da tutti i laboratori veterinari ed umani iscritti al programma che utilizzano lo stesso metodo (colorimetrico), non forzatamente lo stesso strumento. Il laboratorio Oniris di Nantes ha ottenuto un certificato qualità.

Per quanto riguarda lo strumento “Reflovet Plus”, si effettua il controllo qualità quando viene segnalato dallo strumento stesso, sulla schermata principale del display. Si spegne l’apparecchio, si apre la protezione della camera di misura e si pulisce con un cotone imbevuto di alcool, così come la testa di lettura superiore e il supporto rettangolare grigio inferiore. Si attendono 5 minuti, si chiude la camera di protezione e si accende lo strumento. A questo punto, si effettua il controllo con l’aiuto di una striscia reattiva CHECK, fornita dalla ditta: è opportuno verificare che i risultati ottenuti rientrino nell’intervallo di valori

scritti sul flacone delle strisce campione. La striscia reattiva di controllo è utilizzabile per cinque volte.

Il controllo qualità dello strumento Beckman 520 viene effettuato solo quando lo si utilizza. Vengono realizzati tre campioni controllo a tasso basso, medio, alto: in tre cuvette vengono miscelati 2.5ml di reagente e rispettivamente 5µl, 10µl e 15µl di campione controllo, fornito dalla ditta; si mettono al riparo dalla luce per 20 minuti e si passano nello strumento. I 3 valori ottenuti si scrivono manualmente su una scheda, seguiti dalla data e dal nome dell'operatore che ha eseguito il controllo.

10.2.4.2 Raccolta retrospettiva dei dati

I dati della prima sezione di studio sono stati raccolti dal programma del laboratorio Clovis®, attraverso l'estrazione con parole chiave (emolisi, lipemia ed ittero) e, successivamente, elaborati con il programma Microsoft Excel®. In un periodo di 3 anni (dal 1/10/2010 al 1/10/2013), sono stati analizzati 76 campioni emolitici e 5 campioni con alterazioni combinate (emolisi + ittero), 162 campioni lipemici e 67 campioni con alterazioni combinate (lipemia + emolisi), 167 campioni itterici e 5 campioni con alterazioni combinate (ittero + lipemia), rispettivamente di cane e gatto. A differenza dei campioni di Pisa, in alcuni campioni di Nantes non è stata indicata la stima visiva osservata dall'operatore (per gli emolitici 17 cani e 3 gatti; per i lipemici 32 cani e 10 gatti; per gli itterici 9 cani e 33 gatti), quindi non considerati nell'analisi statistica.

10.2.4.3 Raccolta prospettica dei dati

I dati della seconda sezione di studio sono stati ottenuti da uno studio prospettico effettuato nel laboratorio di Nantes, per un periodo di 3 mesi circa (dal 18/10/2013 al 31/01/2014). A cadenza settimanale, quindi al raggiungimento di circa 5-10 campioni alterati, è stata dosata l'emoglobina in 27 campioni emolitici, la bilirubina in 12 campioni itterici, il colesterolo e i trigliceridi in 20 campioni lipemici, rispettivamente di cane e gatto. I campioni, arrivati al laboratorio sono stati centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti come di consueto e, se alterati, ne è stato indicato il grado di alterazione attraverso i simboli "+/-", "+", "++", "+++", "++++" e riposti in frigorifero ad una temperatura di 4°C, fino al momento della misurazione dell'analita in questione.

I campioni lipemici ed itterici sono stati analizzati con lo strumento Rx daytona, precedentemente descritto in questo capitolo.

I dosaggi dell'emoglobina sono stati effettuati prelevando dai campioni emolitici il plasma e trasferendolo in semplici provette di plastica vuote (numerate e con lo stesso codice del campione da analizzare), per una questione di praticità ed organizzazione dei campioni (vedi figura 19).



Figura 19- Campioni emolitici per la misurazione dell'emoglobina (foto laboratorio Oniris di Nantes).

Da ciascuna provetta, sono stati prelevati 10 μ l di plasma emolitico e trasferiti nell'apposita cuvetta (col il numero corrispondente), insieme a 2,5 ml di reagente, mescolati e messi al riparo dalla luce per 20 minuti. Il reagente puro è fornito dalla ditta Randox[®] e contiene i seguenti componenti: ferrocianuro di potassio (0.61 mmol/l), cianuro di potassio (0.77 mmol/l), fosfato di potassio (1.03 mmol/l) e surfactante (0.1%); un volume di reagente viene diluito con 9 volumi di acqua distillata e resta stabile per 6 mesi, ad una temperatura compresa tra 15°-20° C e al riparo dalla luce diretta. Un campione di bilanciamento, costituito solo da 2,5 ml di reagente, viene sempre inserito nello strumento con i campioni da analizzare, non più di 5 a ciclo. Una volta terminata l'analisi, i risultati in g/L sono stati trascritti nell'apposito quaderno.



Figura 20- Campioni emolisati con il rispettivo dosaggio dell'emoglobina (foto laboratorio Oniris di Nantes).

Nei 20 campioni lipemici, sono stati dosati, prima e dopo centrifugazione a 4°C per 10 minuti, i seguenti analiti: albumina, fosfatasi alcalina, alanina aminotransferasi, creatinina, urea, proteine totali, trigliceridi e colesterolo (per questi analiti è stato sufficiente realizzare solo la seconda centrifugazione, in quanto erano già presenti i risultati della centrifugazione basale). Dai campioni lipemici, è stato estratto il plasma lipemico e trasferito in provette di plastica vuote: nell'attesa di essere analizzati, sono stati congelati. Generalmente, anche queste misurazioni sono state effettuate con cadenza settimanale, al raggiungimento di 5-10 campioni. Una volta scongelati a temperatura ambiente, agitati per rendere omogeneo il plasma, sono stati messi in centrifuga a 3000rpm per 10 minuti a 4°C, per rendere il plasma più trasparente: lo strato lipemico è salito in superficie. A questo punto, è stato prelevato il plasma al di sotto dello strato lipemico e trasferito in un'altra provetta di plastica, facendo attenzione a non contaminare il plasma con residui di grasso. Il campione è stato analizzato dallo strumento Rx daytona.

In relazione alle comparazioni effettuate tra i dosaggi dell'analita e la stima visiva dei campioni alterati, è stata creata una scala delle gradazioni di alterazione (“+”, “++”, “+++”, “++++”) dei campioni emolitici, lipemici ed itterici del cane e del gatto al fine di avere un parametro oggettivo da seguire durante la lettura visiva dei campioni alterati.

10.2.5 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati con il programma statistico MedCalc® ed affinché, il programma eseguisse le funzioni statistiche scelte, i seguenti simboli sono stati convertiti come segue:

- +/- come 0,5
- + come 1
- ++ come 2
- +++ come 3
- ++++ come 4

Per studiare la prevalenza e la distribuzione dei campioni emolitici, lipemici ed itterici, dei due laboratori, è stata creata una tabella Excel® con il numero dei campioni emolitici del cane e del gatto di Nantes e di Pisa, secondo il grado di stima visiva (dallo 0,5 al 4), e così è stato fatto anche per i campioni lipemici ed itterici. Sui dati così tabulati, è stato eseguito il test del Chi-quadrato.

Per la comparazione tra la quantità di colesterolo e di trigliceridi dei campioni lipemici del cane e del gatto e la stima visiva della lipemia, così come per la comparazione tra la quantità di bilirubina dei campioni itterici del cane e del gatto e la stima visiva dell'ittero, del laboratorio di Pisa, è stato utilizzato il metodo parametrico che garantisce una miglior precisione di analisi ed ha una curva di distribuzione dei dati che segue un andamento Gaussiano. La normalità della distribuzione dei valori è stata eseguita tramite il Test D'Agostino-Pearson. Per i campioni lipemici, le due variabili paragonate sono state la stima della lipemia e la quantità di colesterolo e trigliceridi espresse in g/L, mentre, per i campioni itterici sono state la stima dell'ittero e la quantità di bilirubina, espressa in mg/L.

Laddove le due variabili erano distribuite normalmente, si è continuato con l'applicazione del test della correlazione, mentre se una o entrambi le variabili non erano distribuite normalmente, è stato applicato il test della regressione.

Lo stesso procedimento statistico (Test D'agostino-Pearson e test di correlazione e regressione) è stato applicato per la comparazione tra la quantità di emoglobina dei campioni emolitici e la stima visiva dell'emolisi, tra la quantità di colesterolo e trigliceridi dei campioni lipemici e la stima della lipemia, tra la quantità di bilirubina dei campioni itterici

e la stima visiva dell'ittero, del laboratorio di Nantes. I campioni non sono stati divisi per specie, perché numericamente pochi per poter effettuare uno studio comparativo accettabile.

Per i dosaggi sui campioni lipemici a centrifugazione basale e dopo centrifugazione a 4°C, effettuati presso il laboratorio di Nantes, sono stati creati dei fogli Excel per ogni analita misurato (albumina, fosfatasi alcalina, alanina aminotransferasi, proteine totali, trigliceridi, colesterolo, urea e creatinina) con i rispettivi dosaggi pre e post-centrifugazione, espressi nelle rispettive unità di misura. È stato così applicato il Test D'agostino-Pearson alle due variabili (centrifugazione basale e a 4°C); laddove le due variabili sono risultate parametriche è stato applicato il T-test per dati appaiati, mentre se una o entrambe le variabili non hanno presentato un andamento gaussiano è stato utilizzato il Wilcoxon test per dati appaiati.

CAPITOLO 11

RISULTATI

11.1 Risultati dello studio retrospettivo dei dati su emolisi, lipemia ed ittero

Nella struttura di Pisa, sono stati rilevati su un totale di campioni analizzati di 10.905 cani e 1.981 gatti, rispettivamente 551 (5.05%) e 147 (7.42%) campioni con alterazioni preanalitiche. Nella struttura di Nantes, su un totale di campioni analizzati di 6.773 cani e 5.095 gatti sono stati invece individuati, rispettivamente, 301 (4.44%) e 181 (3.55%) campioni con alterazioni preanalitiche.

Di seguito, sono riportati i grafici ad istogramma, che mostrano le percentuali dei campioni emolitici, lipemici ed itterici di cane e gatto (con gradazioni statisticamente significative), suddivisi per gradazione, sia di Pisa che di Nantes.

Chart 1- Comparison Nantes-Pisa of hemolysis grade estimation in the dog.

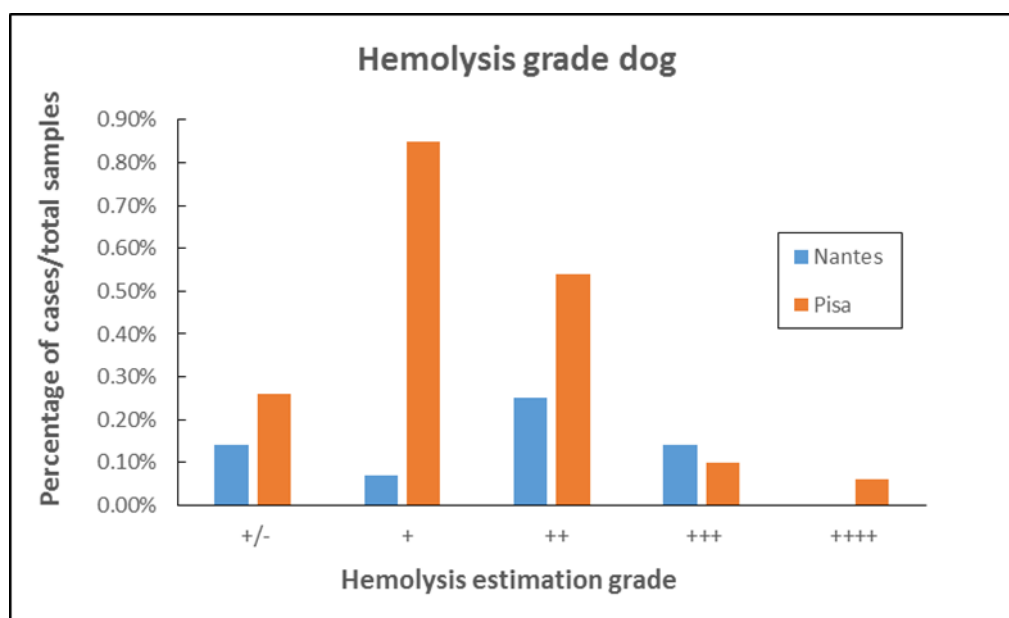
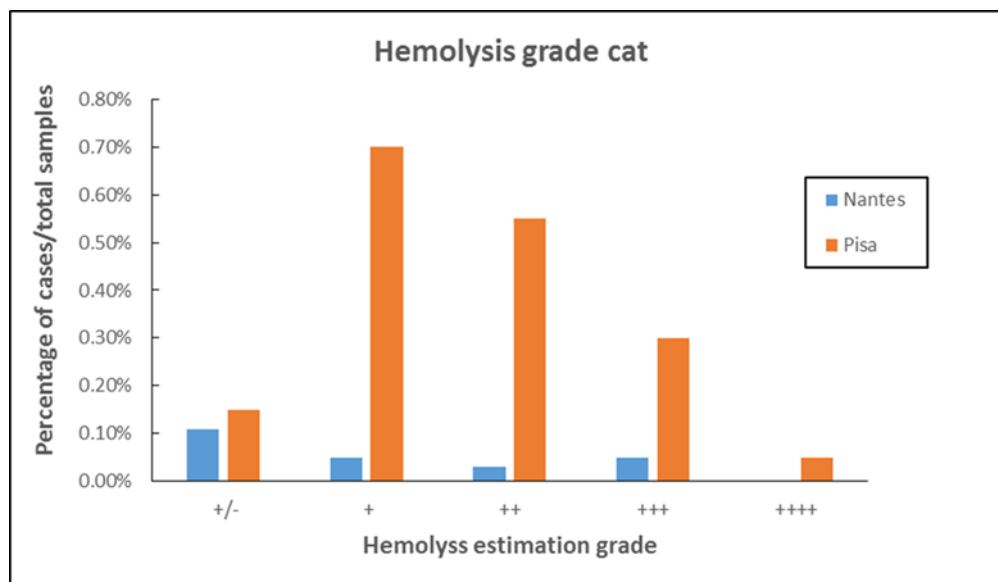


Chart 2- Comparison Nantes-Pisa of hemolysis grade estimation in the cat.



Dal Grafico 1, si nota che i campioni emolitici del cane hanno una prevalenza maggiore nel laboratorio di Pisa per tutte le gradazioni (“+/-“ 0.26%; “+” 0.85%; “++” 0.54%; “++++” 0.06%), eccetto per i campioni con “+++” per i quali si ha una percentuale di 0.14% a Nantes e di 0.10% a Pisa.

Dal Grafico 2, si può notare che, anche i campioni emolitici del gatto hanno una prevalenza maggiore nel laboratorio di Pisa, con percentuali più elevate delle gradazioni di emolisi (“+/-“ 0.15%; “+” 0.70%; “++” 0.55%; “+++” 0.30%; “++++” 0.05%); nel laboratorio di Nantes, solo i campioni con il grado “+/-“ raggiungono una percentuale di 0.11, tutti gli altri non superano lo 0.05 %.

Chart 3- Comparison Nantes-Pisa of lipemia grade estimation in the dog.

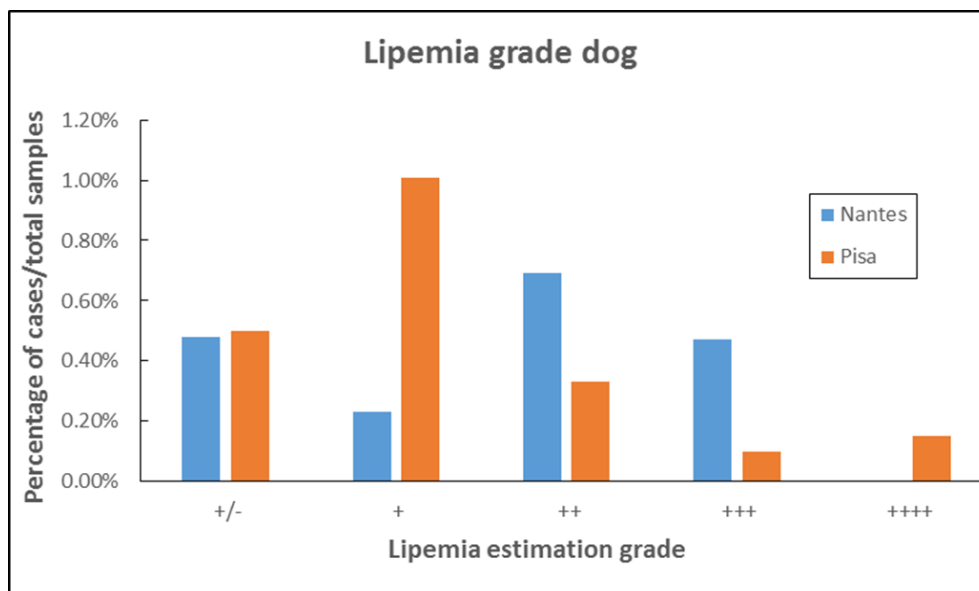
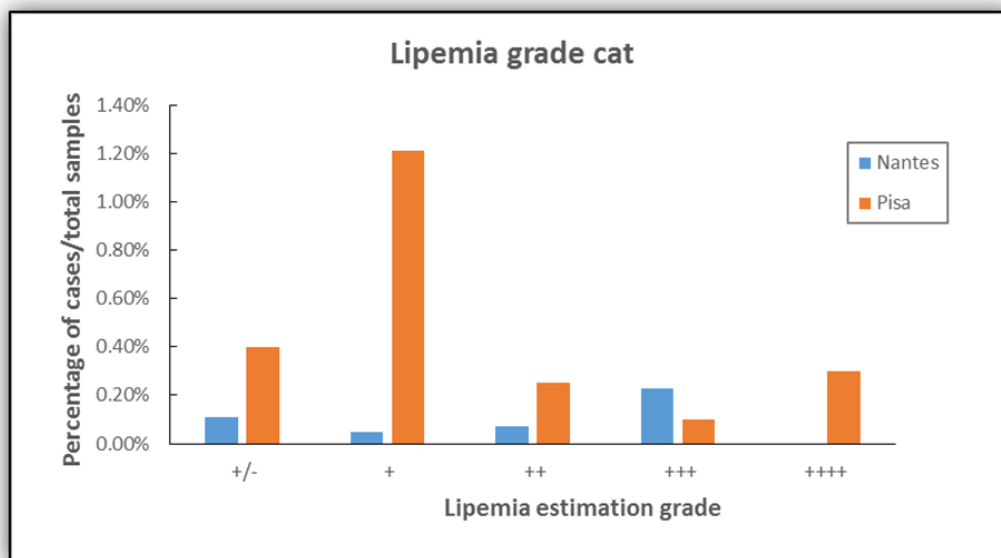


Chart 4- Comparison Nantes-Pisa of lipemia grade estimation in the cat.



Dal Grafico 3, si può notare che, i campioni lipemici del cane con un grado di lipemia “+/-”, hanno raggiunto una percentuale simile tra i due laboratori (0.48% Nantes, 0.50% Pisa); i

campioni lipemici con il grado “+” hanno una percentuale maggiore a Pisa (1.01%) rispetto a Nantes (0.23%); per i campioni con il grado “++” si ha una percentuale di 0.69% a Nantes e di 0.33% a Pisa; per i campioni con il grado “+++” si ha 0.47% a Nantes e 0.10% a Pisa; i campioni lipemici con il grado “++++” non sono stati analizzati a Nantes (0.00%), mentre a Pisa è presente lo 0.15%.

Dal Grafico 4, si nota che, i campioni lipemici del gatto con un grado di lipemia “+/-“ hanno una percentuale di 0.11% a Nantes e di 0.40% a Pisa; i campioni lipemici con il grado “+” hanno, anche nel gatto, una percentuale maggiore a Pisa (1.21%) rispetto a Nantes (0.05%); i campioni lipemici con il grado “++” hanno una percentuale di 0.25% a Pisa e di 0.07% a Nantes; i campioni lipemici con grado “+++” presentano una percentuale di 0.23% a Nantes ed 0.10% a Pisa; i campioni con una grado “++++” non sono stati analizzati a Nantes (0.00%), mentre a Pisa si ha la presenza dello 0.30%.

Chart 5- Comparison Nantes-Pisa of Icterus grade estimation in the dog.

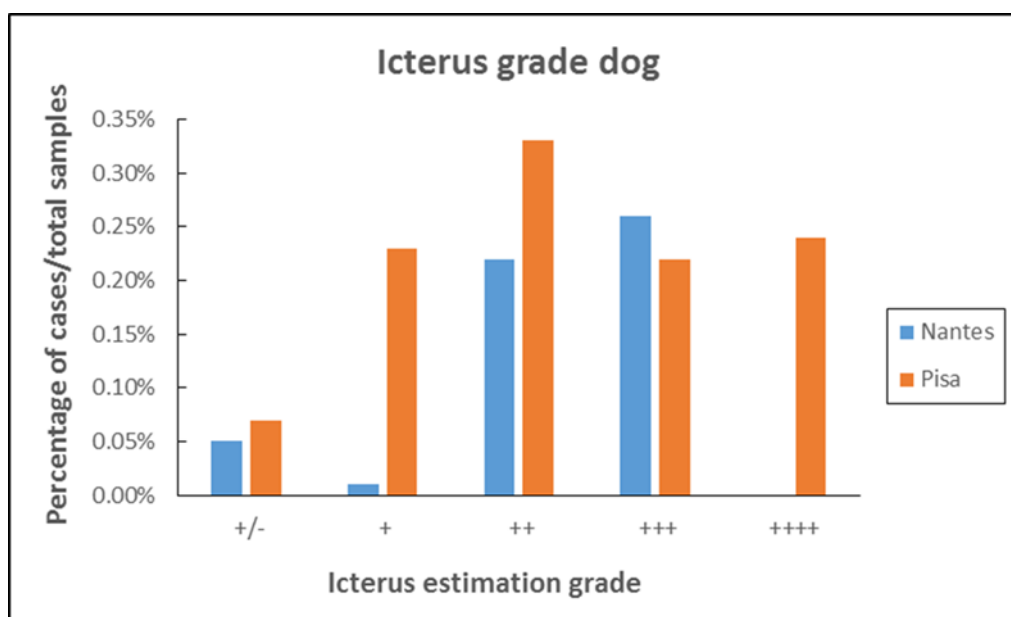
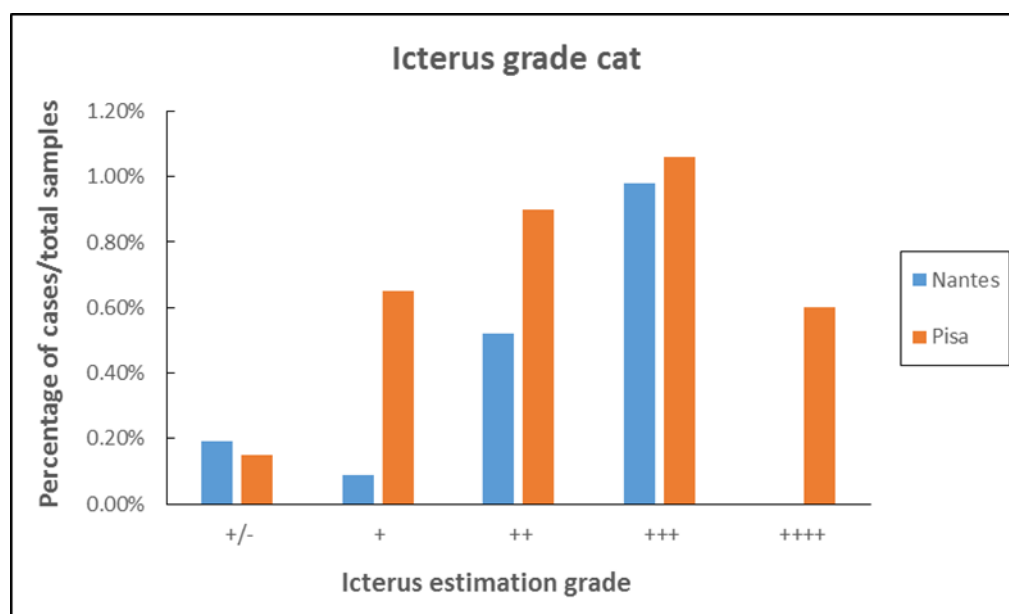


Chart 6- Comparison Nantes-Pisa of Icterus grade estimation in the cat.



Dai Grafici 5 e 6 si evidenzia che le percentuali dei campioni itterici di cane e gatto sono maggiori nel laboratorio di Pisa. Nel cane, le percentuali dei campioni con grado “+” (0.23%) e “++++” (0.24%) sono nettamente superiori rispetto a quelle di Nantes (“+” 0.01% e “++++” 0.00%). Nel gatto, si nota che le percentuali dei campioni con grado “+/-“ di Nantes (0.19%) e Pisa (0.15%) sono pressoché simili, mentre quelle con grado “+”, “++” e “++++” di Pisa sono nettamente superiori a quelle di Nantes.

Dall’analisi statistica applicata allo studio comparativo dei campioni lipemici di cane e gatto, del laboratorio di Pisa, in particolare tra la quantità di colesterolo e trigliceridi e la stima visiva della lipemia, i risultati ottenuti non sono statisticamente significativi. I dati si considerano almeno inizialmente, di un certo significato statistico, quando il coefficiente di correlazione (r) o il coefficiente di regressione (r²) sono maggiori di 0.3.

Dall’applicazione del test D’Agostino-Pearson, entrambe le variabili sono risultate non distribuite normalmente, per cui è stato applicato il test della regressione. Di seguito sono riportati i coefficienti di regressione di ogni comparazione analizzata:

- comparazione tra la quantità di colesterolo e la stima della lipemia nel cane ($r^2=0.012$);
- comparazione tra la quantità di colesterolo e la stima della lipemia nel gatto ($r^2=0.005$);
- comparazione tra la quantità di trigliceridi e la stima della lipemia nel cane ($r^2=0.2773$);
- comparazione tra la quantità di trigliceridi e la stima della lipemia nel gatto ($r^2=0.007$).

I risultati ottenuti dalla comparazione dei campioni itterici di cane e gatto, tra la quantità di bilirubina e la stima visiva dell'ittero sono da considerare scarsamente significativi, ma migliori rispetto alle valutazioni della lipemia. Il test D'agostino-Pearson ha mostrato che le due variabili (quantità di bilirubina e stima visiva dell'ittero) non sono parametriche; dal test di regressione, successivamente applicato, sono emersi i seguenti risultati:

- comparazione tra quantità di bilirubina e la stima visiva dell'ittero nel cane ($r^2=0.326$);
- comparazione tra quantità di bilirubina e la stima visiva dell'ittero nel gatto ($r^2=0.328$).

11.2 Risultati dello studio prospettico su emolisi, lipemia ed ittero

Lo studio comparativo dei 27 campioni emolitici (sono stati considerati 11 campioni con emolisi e lipemia ed 1 campione con emolisi ed ittero), analizzati presso il laboratorio di Nantes, tra la quantità di emoglobina e la stima visiva dell'emolisi ha portato a risultati non statisticamente significativi. Dall'applicazione del test D'agostino-Pearson, la variabile "stima dell'emolisi" è risultata distribuita normalmente, mentre la variabile "quantità di emoglobina" non è rientrata nella distribuzione normale e quindi, è stato applicato il test di regressione ($r^2=0.030$).

La comparazione tra la quantità di colesterolo e la stima visiva della lipemia, ha dato risultati statisticamente non significativi. Dal test D'Agostino-Pearson la variabile "stima della lipemia" è risultata distribuita normalmente, al contrario della variabile "quantità colesterolo", che non ha avuto una distribuzione normale; l'applicazione del test di regressione ha rivelato un $r^2=0.0007$. Anche la comparazione tra la quantità di trigliceridi e la stima visiva della lipemia è risultata non statisticamente significativa: dal test D'Agostino-Pearson la variabile "stima della lipemia" è risultata distribuita normalmente, mentre la

variabile “quantità trigliceridi” non ha una distribuzione normale; dal test di regressione è emerso un $r^2 = 0.275$.

Dallo studio comparativo tra la quantità di bilirubina e la stima visiva dell’ittero, i risultati sono considerati non statisticamente significativi. Dal test D’Agostino-Pearson, entrambe le variabili (quantità di bilirubina e stima dell’ittero) sono risultate distribuite normalmente ed è stato applicato il test delle correlazione ($r = 0.018$).

I dosaggi sui campioni lipemici a centrifugazione basale e dopo centrifugazione a 4°C, effettuati presso il laboratorio di Nantes, hanno mostrato differenze statisticamente significative per quanto riguarda i seguenti analiti: colesterolo, trigliceridi e proteine totali. I dati si considerano statisticamente significativi se $P < 0.05$.

Dall’analisi del colesterolo, dopo applicazione del test D’Agostino-Pearson, le due variabili (risultato basale e centrifugato) sono risultate non parametriche e quindi, è stato applicato il Wilcoxon test ($p = 0.0186$) (vedi Chart 7). Anche dall’analisi dei trigliceridi, dopo applicazione del test D’agostino-Pearson, le due variabili non sono risultate parametriche e quindi, è stato applicato il Wilcoxon test ($p < 0.0001$) (vedi Chart 8).

Chart 7- Comparison of Cholesterol in lipemic samples before and after centrifugation

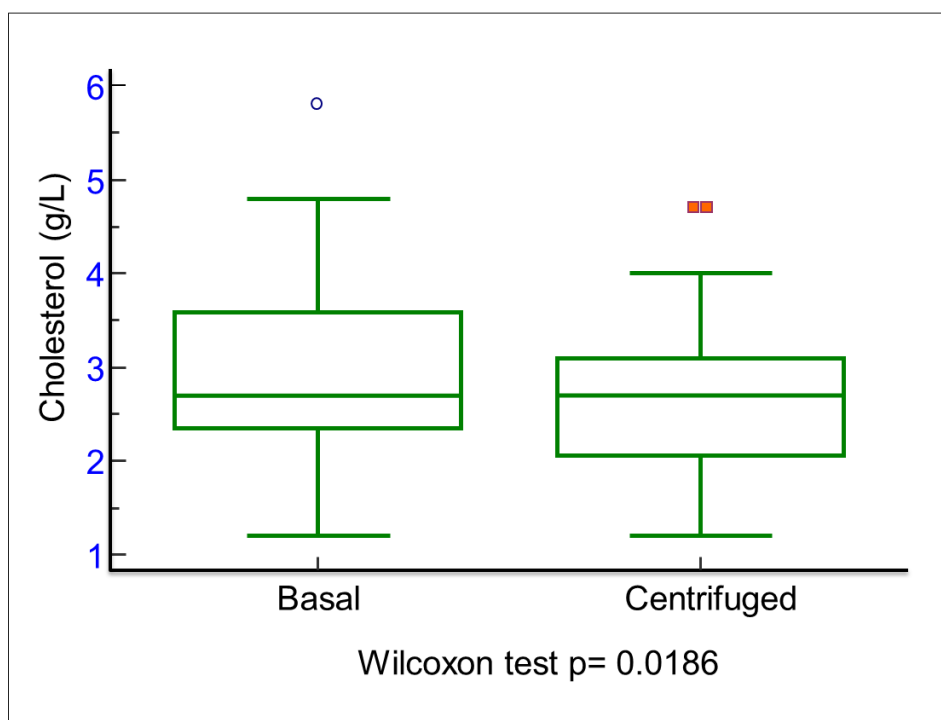
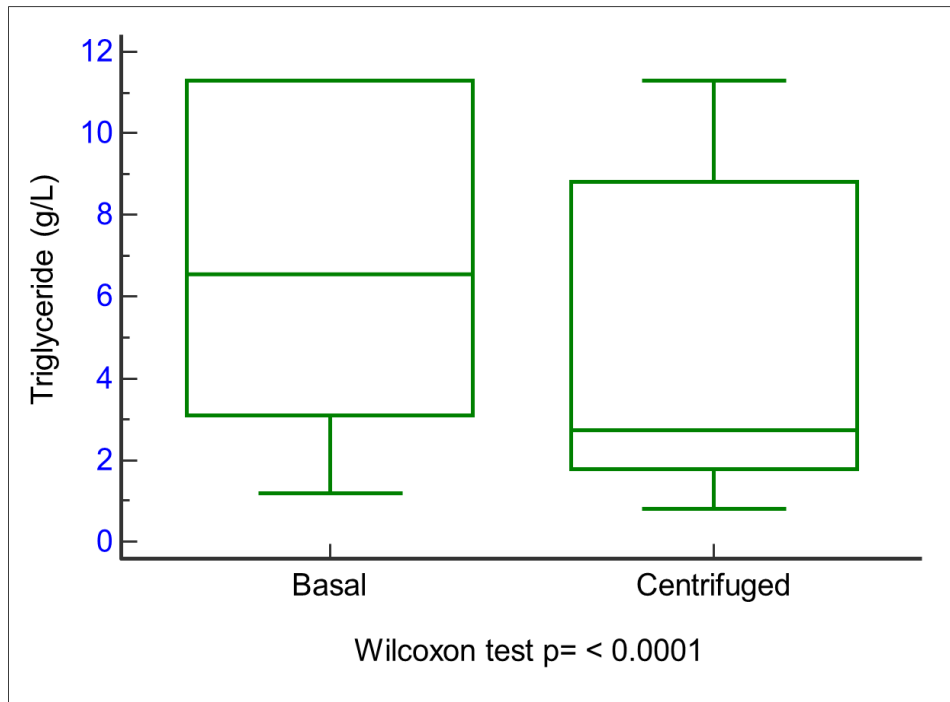
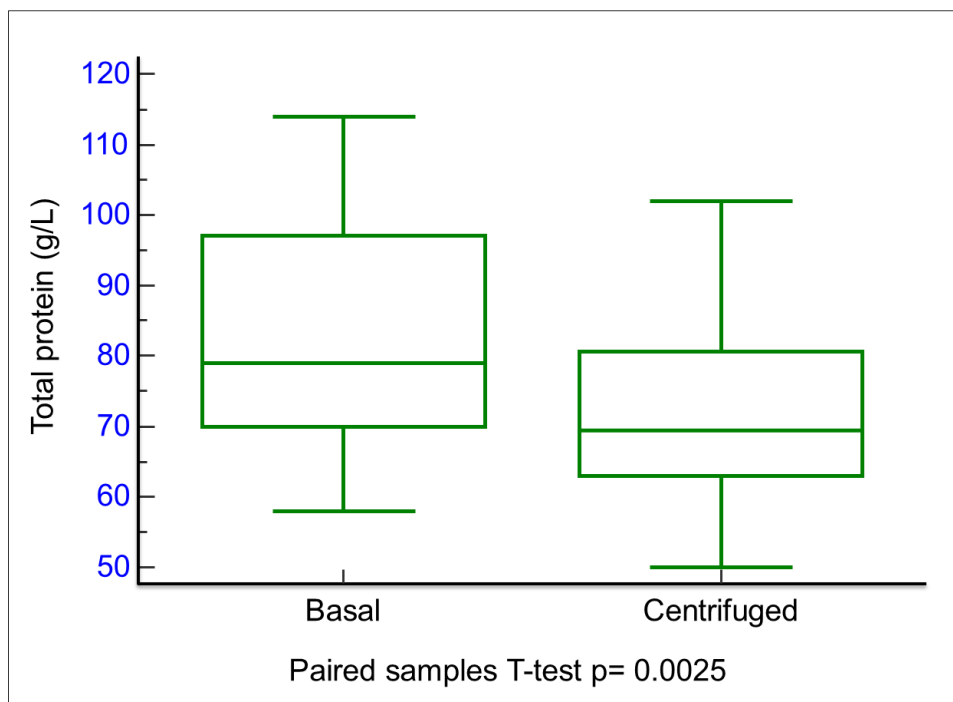


Chart 8- Comparison of Triglyceride in lipemic samples before and after centrifugation



Dall'analisi delle proteine totali, dopo applicazione del test D'Agostino Pearson, le due variabili (risultato basale e centrifugato) sono risultate parametriche e quindi, è stato applicato il T-test per dati appaiati ($p = 0.0025$) (vedi Chart 9).

Chart 9- Comparison of Total Protein in lipemic samples before and after centrifugation



Tutti gli altri analiti misurati sono risultati non statisticamente significativi: albumina ($p=0.969$); fosfatasi alcalina ($p=0.2676$); alanina aminotransferasi ($p=0.0580$); urea ($p=0.875$); creatinina ($p=0.1294$).

Di seguito vengono riportate le foto dei gradi di alterazione dei campioni emolitici, lipemici ed itterici del cane e del gatto:

Figura 21- Gradazioni dell'emolisi

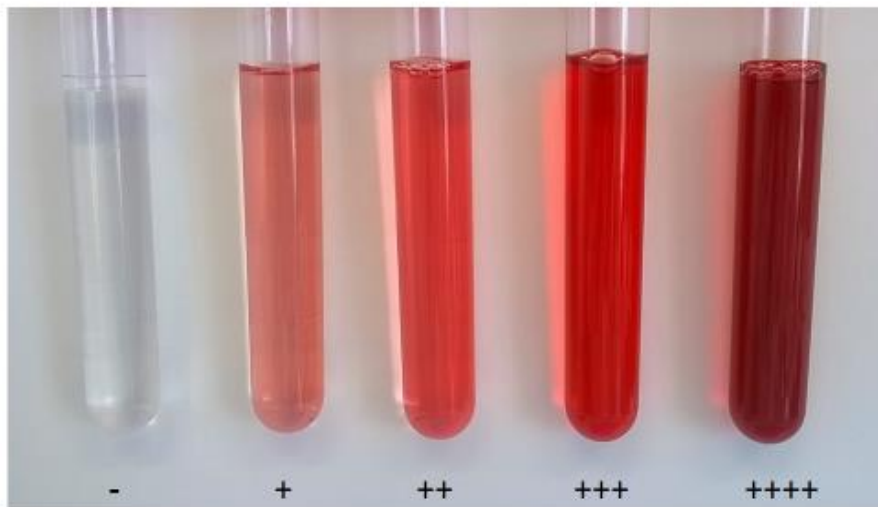


Figura 22- Gradazioni della lipemia

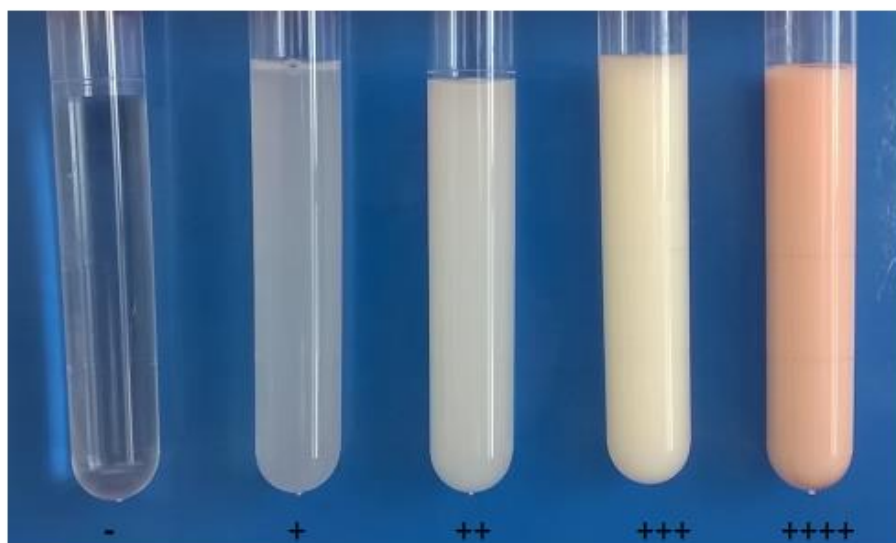
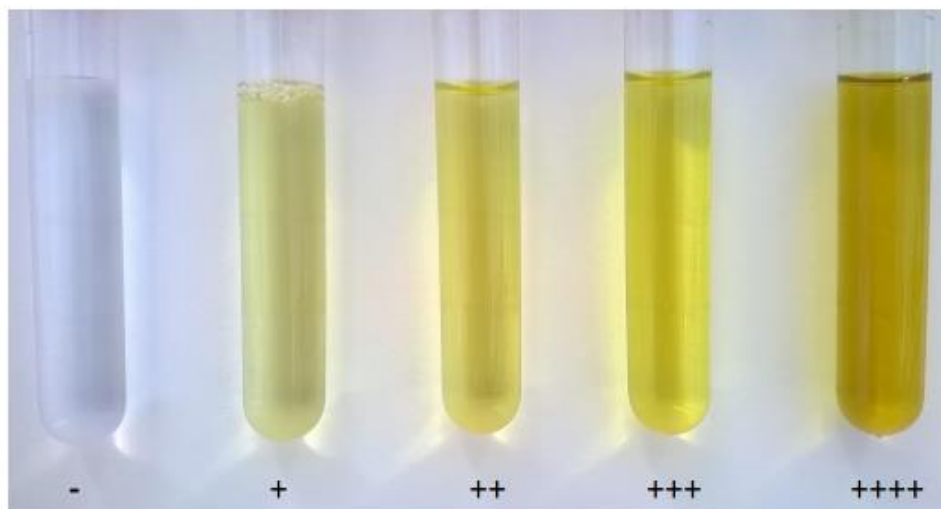


Figura 22- Gradazioni dell'ittero



CAPITOLO 12

CONCLUSIONI

Le alterazioni o gli errori preanalitici sono uno dei problemi critici che possono influenzare la qualità del risultato di dosaggi biologici effettuati nei laboratori di Patologia Clinica, sia in medicina umana che veterinaria. Questa tesi ha affrontato ed indagato le problematiche derivanti dalla ricezione di campioni biologici di cani e di gatti con le alterazioni da emolisi, lipemia e ittero.

È stato documentato che, nella struttura di Pisa, vengono ricevuti un numero maggiore di campioni con alterazioni preanalitiche (5.05% di cane e 7.42% di gatto) rispetto a quella di Nantes (4.44% di cane e 3.55% di gatto), e più precisamente:

- 1.81% di emolitici, 2.09% di lipemici e 1.09% di itterici, 0.06% di alterazioni combinate (emolitici ed itterici, lipemici ed emolitici, lipemici ed itterici) del cane nella sede di Pisa;
- 1.75% di emolitici, 2.26% di lipemici, 3.36% di itterici e 0.05% di alterazioni combinate del gatto nella sede di Pisa
- 0.60% di emolitici, 1.87% di lipemici, 0.54% di itterici e 1.43% di alterazioni combinate del cane nella sede di Nantes;
- 0.24% di emolitici, 0.46% di lipemici, 1.78% itterici e 1.78% di alterazioni combinate del gatto nella sede di Nantes.

Nei laboratori di medicina umana è stata riportata una percentuale di errore preanalitico compresa tra il 32% ed il 75% degli errori totali (includendo quelli preanalitici, analitici e postanalitici)⁽⁵⁾. Un recente studio, condotto nel 2011, in un pronto soccorso della città di Timisoara (Romania) ha riportato una percentuale di campioni emolitici di 0.40%, senza che sia specificato il numero totale di campioni analizzati⁽⁴¹⁾. Altri autori, in uno studio condotto presso l'Università degli Studi di Verona, hanno riportato una percentuale di campioni emolitici pari all'1.15% su 309.376 campioni totali, analizzati nel periodo di un anno⁽⁴²⁾.

In medicina veterinaria, uno studio condotto in un periodo di otto anni, ha evidenziato una percentuale di errore preanalitico compresa tra il 52% ed il 77% degli errori totali (3.015), in questo intervallo il 58% deriva da campioni emolitici ed un 30% da campioni lipemici⁽⁴³⁾; i campioni itterici non vengono considerati in questo studio, così come nel resto nei rari lavori presenti in campo veterinario. Come si evince dalla bibliografia riportata in letteratura,

anche in medicina umana sembra che non siano presenti studi dettagliati sull'influenza dei campioni lipemici e tanto meno dei campioni itterici sugli errori di laboratorio.

Nel laboratorio di Pisa si evidenzia una prevalenza maggiore delle percentuali in tutte le gradazioni dei campioni emolitici di cane e gatto. La tecnica di prelievo è molto importante al fine di evitare il processo emolitico: presso l'ospedale veterinario di Nantes, così come in quello di Pisa, il prelievo viene effettuato con aghi da 20 G a 22 G nel cane e da 22 G a 25 G nel gatto. In entrambi i laboratori i campioni provenienti sia dall'Ospedale, sia quelli inviati dall'esterno, appena arrivano, vengono subito analizzati. L'unica differenza è che nel laboratorio di Nantes, raramente, campioni di siero vengono messi in bagnomaria per facilitare la formazione del coagulo e la "spremitura del siero": i campioni arrivano tutti in provette con litio eparina che vengono subito centrifugate a 3000 rpm per 5 minuti. Si potrebbe ipotizzare che, tempi prolungati in bagnomaria a 37°C portino ad emolisi il campione, cosa che spiegherebbe il maggior numero di campioni emolitici a Pisa, così come la presenza di una casistica maggiore di pazienti affetti da anemia. In realtà il siero è il substrato di elezione per le analisi biochimiche, per la sieroelettroforesi e per i dosaggi ormonali⁽¹⁷⁾.

Dallo studio si nota come a Nantes sia presente una prevalenza più alta di campioni lipemici nel cane rispetto a quelli emolitici, ma comunque sempre inferiore a quella di Pisa. I campioni lipemici del gatto sono pochi a Nantes, rispetto Pisa. Non è stato indagato, se la lipemia dei campioni sia dovuta ad una lipemia postprandiale, o ad una patologia primaria o secondaria dell'animale; potrebbe essere interessante individuare quale sia la causa del campione lipemico, verificando ad esempio anche il tipo di alimentazione dei pazienti.

I campioni itterici di entrambe le specie sono quelli maggiormente analizzati nei due laboratori, sebbene a Pisa siano presenti percentuali più elevate, soprattutto nel gatto. La spiegazione potrebbe derivare da una casistica maggiore di pazienti con patologie gastroenteriche ed epatiche, presente a Pisa.

L'analisi statistica, applicata ai dati ottenuti dallo studio comparativo dei campioni lipemici ed itterici di Pisa e dei campioni emolitici, lipemici ed itterici di Nantes, ha mostrato che non esiste un'associazione statisticamente significativa tra la quantità della sostanza interferente (emoglobina, colesterolo, trigliceridi e bilirubina) e la stima visiva dell'emolisi, della lipemia e dell'ittero. Ovviamente, si tratta di una comparazione tra due metodiche con margini di errore diversi: una metodica strumentale automatizzata e computerizzata, in cui la

percentuale di accuratezza e precisione è certamente inferiore rispetto ad una metodica umana soggettiva. La lettura visiva dei campioni alterati è, infatti, una stima soggettiva dell'operatore, che può cambiare da un operatore all'altro: in entrambi i laboratori, la lettura è effettuata da più tecnici e questo può creare differenze di lettura significative. Il Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha approvato e pubblicato, nel 2012, una linea guida per i campioni emolitici, lipemici ed itterici umani, creando una scala di colori delle gradazioni da utilizzare nei laboratori, in modo da effettuare una stima visiva oggettiva delle alterazioni preanalitiche e rendere più reale e significativo il grado di interferenza stimato⁽⁴⁴⁾. In questo lavoro, è stato proposto un simile progetto di standardizzazione della stima semi-quantitativa di emolisi, lipemia ed ittero per il cane e il gatto: il plasma umano ha una colorazione leggermente gialla, mentre nel cane e nel gatto è trasparente ed è stato quindi necessario creare una gradazione specifica.

Dalla comparazione dei dosaggi degli analiti (albumina, fosfatasi alcalina, alanina aminotransferasi, proteine totali, colesterolo, trigliceridi, urea e creatinina) sui campioni lipemici di Nantes, saggiati dopo una centrifugazione iniziale (basale) e dopo una centrifugazione a 4°C, è stato possibile verificare che è possibile ottenere risultati statisticamente significativi solo per colesterolo ($p= 0.0186$), trigliceridi ($p< 0.0001$) e proteine totali (0.0025). I Grafici 7-8-9 riportano come la distribuzione dei campioni basali e post-centrifugazione sia differente ed i valori della seconda centrifugazione siano inferiori rispetto alla centrifugazione basale. La seconda centrifugazione permette infatti, di attenuare se non del tutto almeno in parte, la torbidità del campione lipemico, concentrando lo strato lipemico in superficie e permettendo allo strumento spettrofotometrico una lettura reale del campione.

Questa tesi ha evidenziato la necessità:

- di analizzare e tenere sotto controllo le alterazioni preanalitiche da campioni con alterazioni da emolisi, lipemia e ittero;
- di individuare dei correttivi per ridurre l'interferenza di queste alterazioni nella determinazione del dosaggio di vari analiti impiegati in biochimica clinica;
- migliorare il rapporto tra il veterinario che effettua i prelievi, modificando anche le tecniche di prelievo, e il laboratorio per la migliore gestione dei campioni con alterazioni preanalitiche;

- di segnalare l'importanza delle alterazioni preanalitiche nella interpretazione dei risultati dei dosaggi in biochimica clinica per la loro possibile interferenza.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gavazza A, Pasquini A, Gugliucci B *et al.* Determinazione dei principali parametri biochimici del cane e del gatto mediante chimica a secco (VETTEST® 8008) e chimica liquida-confronto e valutazione dei risultati. *Veterinaria*, vol.2, pp. 9-19, 2006.
- 2) Lubas G, Interpretazione degli esami di laboratorio. *In* Appunti di ematologia clinica veterinaria. Ed. Lubas G., 1°edizione Arnus University Book, pp.8-9, 2011.
- 3) Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D *et al.* Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol.51, pp.229-241, 2013.
- 4) Schleicher E, Clinical chemistry laboratories: current status, problems and diagnostic prospects. *Bioanal. Chem.*, Vol.384, pp.124-131,2006.
- 5) Hooijerg H.E. Preanalytical errors in the veterinary clinical laboratory, 15th Annual Congress of the European Society and College of Veterinary Clinical Pathology ESVCP/ ECVCP, November 6-9, 2013.
- 6) Villiers E, L'esecuzione dei test di laboratorio a livello ambulatoriale o presso laboratori esterni in *Gli esami di laboratorio*, edizione italiana a cura di Saverio Paltrinieri, Utet, pp.1, 2005.
- 7) Plebani *et al.* Note metodologiche sull'acquisizione e sull'uso dei sistemi chiusi sottovuoto per il prelievo, il trattamento e la conservazione dei campioni ematici venosi destinati alla diagnostica di laboratorio. *Bioch. Clin.*, vol.37, pp.303-311, 2013.
- 8) Willard M.D. Nozioni generali di laboratorio *In* Diagnostica di laboratorio nei piccoli animali, 4° edizione, edizione italiana a cura di Alessandra Fondati, Elsevier Masson, pp.7,8, 2004.
- 9) Vap L.M. *et al.* ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical and analytical factors for hematology for mammalian and nonmammalian species, hemostasis, and crossmatching in veterinary laboratories, *Vet. Clin. Pathol.*, vol.41, pp. 8-17, 2012.
- 10) Weiser M. *et al.* Quality Control Recommendations and Procedures for In-Clinic Laboratories, *Vet. Clin. Small Anim.*, Vol.37, pp. 244-252, 2007.
- 11) Zang J. *et al.* Evaluation of Interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clin.Chim. Acta*, vol.412, pp. 1550-1553, 2011.

- 12) Jacobs R.M. et al. Effects of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia in clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine, and feline sera. *Can. Vet. J*, vol.33, pp. 603-608, 1992.
- 13) Morandini M, Criteri di qualità per l'accettabilità dei campioni, *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio - Italian Journal of Laboratory Medicine*, vol.2, pp. 32-41, 2006.
- 14) Villiers E, Interpretazione dei dati di laboratorio in *Gli esami di laboratorio*, edizione italiana a cura di Saverio Paltrinieri, Utet, pp.12-14, 2005.
- 15) Lubas G, Prelievo del sangue ed anticoagulanti in *Appunti di ematologia clinica veterinaria*. Ed. Lubas G., 1° edizione Arnus University Book, pp.22-23, 2011.
- 16) Lubas G, Errori nel prelievo del sangue. In *Appunti di ematologia clinica veterinaria*. Ed. Lubas G., 1° edizione Arnus University Book, pp 29-32, 2011.
- 17) Gilor S. et al. Common Laboratory Artifacts Caused by Inappropriate Sample Collection and Transport:How to Get the Most out of a Samples. *Topics in Companion Animal Medicine*, vol.26, pp.110-128, 2011.
- 18) Lubas G, Tecniche e metodiche in biochimica clinica veterinaria in *Appunti di ematologia clinica veterinaria*. Ed Lubas G., 1° edizione Arnus University Book, pp. 354-364, 2011.
- 19) Diagnostic in-clinic, <http://www.idexx.it/smallanimal/inhouse/vetlab/vettest-chemistry.html> Accesso al sito 29/04/2014.
- 20) Laboratorio chimica clinica, <http://www.scilvet.com>. Accesso al sito 2/05/2014.
- 21) Lubas G, Qualità metrologiche degli esami di laboratorio in *Appunti di ematologia clinica veterinaria*. Ed. Lubas G, 1° edizione Arnus University Book, pp. 13-15, 2011.
- 22) Lippi G, Caputo M, Banfi G *et al.* Raccomandazioni di consenso SIBioC-SIMeL per la rilevazione e gestione dei campioni emolisi e utilizzo dell'indice di emolisi, *biochimica clinica*, vol. 35, pp.481-490, 2011.
- 23) Koseoglu M *et al.* Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters, *Biochimica Medica*; 21(1):79–85, 2011.
- 24) Lubas G, Errori nel prelievo di sangue in *Appunti di ematologia clinica veterinaria*. Ed. Lubas G, 1° edizione Arnus University Book, pp. 29-32, 2011.
- 25) Giavarina D, Filatondi E, Zerbato F *et al.* La riduzione della pressione di aspirazione diminuisce l'emolisi nei prelievi da catetere intravenoso, *Biochimica clinica*, vol.37, n.4, pp. 283-286, 2013.

- 26) Lubas G, Emoglobina in Appunti di ematologia clinica veterinaria. Ed. Lubas G, 1° edizione Arnus University Book, pp. 56-58, 2011.
- 27) Willard M.D, Introduzione alle analisi chimiche sieriche: gli artefatti nelle determinazioni biochimiche, in Diagnostica di laboratorio nei piccoli animali, 4° edizione, edizione italiana a cura di Alessandra Fondati, Elsevier Masson, pp.110-113, 2004.
- 28) Ford BR, La gestione clinica dei pazienti lipemici, Supplemento a Veterinaria, Anno 14, n°2, pp.55-63, 2000.
- 29) Schenck P, L'iperlipemia nel cane: cause e trattamento nutrizionale, da Enciclopedia della nutrizione del cane, Royal Canin,IVIS, pp.237-250.
- 30) Nicolak N, Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management, Biochemia Medica; vol.24(1), pp.57-67, 2014.
- 31) Lippi G, Banfi G, Buttarello M *et al.* Raccomandazioni per la rilevazione e la gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici, biochimica clinica, vol. 31, n. 3, pp.216-224, 2007.
- 32) Lubas G, Segni Clinici in Appunti di Diagnostica di laboratorio, 2012.
- 33) Marcato P.S., Fegato e pancreas in Patologia sistematica veterinaria, Edagricole, pp.745-826, 2008.
- 34) Sticova E, Milan J, New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications, Worl Journal of Gastroenterology, vol.19, pp.6398-6407, 2013.
- 35) H. Kroll' M, J. Elin R, Interference with Clinical Laboratory Analyses, Clin. Chem., vol. 40, pp. 1996-2005, 1994.
- 36) Profilo epatico del cane e del gatto, <http://www.vetpedia.it/site/content/profilo-epatico-nel-cane-e-nel-gatto>, accesso al sito 24/05/2014.
- 37) Manuale operativo Lysis.
- 38) <http://www.randox.com>, accesso al sito il 22/08/2014.
- 39) Manuale operativo Rx daytona.
- 40) Manuale operativo Beckman DU 520.
- 41) Daniela Stefania Grecu, Daliborca Cristina Vlad, Victor Dumitrascu, Quality Indicators in the Preanalytical Phase of Testing in a Stat Laboratory, Lab Medicine Winter 2014, 45;1:74-81, Westgard J., A look at the preanalytical errors rates, <http://www.westgard.com/pre-analytical-errors-2014.htm>.

- 42) Lippi G, Bassi A, Brocco G *et al.* Preanalytic Error Tracking in a Laboratory Medicine Department: Results of a 1-Year Experience, *Clinical Chemistry*, vol.52, pp.1443, 2006.
- 43) Hooijberg E, An error management system in a veterinary clinical laboratory, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(3) pp.458-468, 2012.
- 44) Smith M B, Chan Y W, Dolci A *et al.*, Hemolysis, Icterus and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratories Analysis; Approved Guideline, Italian Society of clin. Biochem. and clin. Molecular biology, vol. 32, pp. 13, 2012.

Ringraziamenti

Un sincero ringraziamento al Professor George Lubas, per avermi seguito durante il mio percorso di tesi dandomi una formazione preziosa, per la sua disponibilità e per la sua perseveranza nello stimolare i propri studenti a fare esperienze di studio all'estero, e senza il quale non avrei potuto fare.

Ringrazio la Dottoressa Alessandra Gavazza, per i suoi insegnamenti, i suoi consigli, il suo prezioso aiuto durante la stesura di questo lavoro, nonché per la sua straordinaria simpatia.

Ringrazio tutto lo staff del laboratorio del Dipartimento di clinica veterinaria di San Piero a Grado, che mi ha sempre aiutato.

Ringrazio la Professoressa Brigitte Siliart, per avermi accolto nella sua facoltà avendomi fatto sentire a casa, nonché per avermi dato preziosi insegnamenti.

Ringrazio il mio tutor francese Caroline Berder, per i suoi insegnamenti, la sua disponibilità, la sua gentilezza e simpatia.

Ringrazio lo staff del laboratorio dell'ospedale veterinario dell'École Vétérinaire di Nantes, che mi ha aiutato moltissimo durante il mio lavoro, dimostrando cortesia, disponibilità e pazienza.

Ringrazio mio padre, sempre fiero e orgoglioso dei miei studi, mi ha sempre stimolato ed incoraggiato a raggiungere il mio obiettivo, dandomi questa opportunità.

Ringrazio mia madre, che seppur difficile da capire, a modo suo, mi ha stimolato a non mollare mai.

Ringrazio mio nonno Americo, un grande sapiente che ha sempre creduto in me e nella mia carriera scolastica.

Ringrazio le mie nonne, che mi hanno sempre sostenuto ed incoraggiato.

Un ringraziamento speciale al mio compagno Michele, per il rispetto che ha sempre avuto e che continua ad avere per la mia passione e per il mio lavoro, nonché per l'incoraggiamento che mi ha sempre dato nell'affrontare le mie esperienze estere e per la fiducia che, da sempre, ripone in me.

Ringrazio Marico, per i suoi "Bimba come va?", per i momenti passati insieme a parlare della mia passione, per il suo interesse ad il mio percorso, per la persona che era e che resterà sempre nella memoria e nel ricordo.

