

RACCOMANDAZIONI E LINEE GUIDA

Raccomandazioni della Federazione Italiana delle Società di Medicina di Laboratorio (FISMeLab) per il trasporto del materiale biologico

The transport of biological materials: a proposal from the Italian Federation of the Societies of Laboratory Medicine (FISMeLab)

Valentino MICONI ¹, Bruno BRANDO ^{2,3}, Pierangelo CLERICI ^{4,5,6}, Filippo CRIVELLI ^{7,8},
 Francesco CURCIO ^{9,10}, Roberto GIARDINI ^{8,11}, Enrico MAGLIANO ⁶, Cosimo OTTOMANO ^{12,13,14},
 Sabine STIOUI ^{15,16}, Erminio TORRESANI ^{6,11}, Martina ZANINOTTO ^{13,17}, Anna Maria CENCI ^{1*}

¹Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL), Castelfranco Veneto, Treviso, Italia; ²Laboratorio di Ematologia e Centro Trasfusionale, ASST Ovest Milanese, Legnano, Milano, Italia; ³ISCCA – Società Italiana per l'Analisi Citometrica Cellulare affiliata to ESCCA – Italian Society for Cytometric Cell Analysis, Milano, Italia; ⁴Unità Operativa di Microbiologia e Laboratorio Analisi, ASST Ovest Milanese, Legnano, Milano, Italia; ⁵Presidente FISMeLab, Milano, Italia; ⁶AMCLI – Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Milano, Italia; ⁷Direttore Struttura Complessa Aziendale di Anatomia Patologica, ASST Valle Olona, Busto Arsizio, Varese, Italia; ⁸SIAPeC-IAP – Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica – Segretario Regionale, Milano, Italia; ⁹Dipartimento di Area Medica, Università degli Studi di Udine, Udine, Italia; Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine, Udine, Italia; ¹⁰SIPMeT – Società Italiana di Patologia e Medicina Traslazionale, Rende, Cosenza, Italia; ¹¹IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italia; ¹²Direzione Medica Synlab Italia, Monza, Italia; ¹³SIBioC – Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica – Medicina di Laboratorio, Milano, Italia; ¹⁴Coordinatore del Gruppo di Lavoro FISMeLab, Milano, Italia; ¹⁵Laboratorio Analisi Sezione di Citogenetica e Genetica Medica, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano, Italia; ¹⁶SIGU – Società Italiana di Genetica Umana, Roma, Italia; ¹⁷Unità Operativa Complessa di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Padova, Padova, Italia

*Autore di contatto: Anna Maria Cenci, Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio, Via Ponchini 17/int. 7, 31033 Castelfranco Veneto (TV), Italia. E-mail: amc.cenci@gmail.com

RIASSUNTO

Il trasporto dei campioni biologici negli ultimi anni è divenuto un tema strategico. La loro movimentazione da evento raro costituisce oggi una prassi frequente per la tendenza dei laboratori pubblici di andare verso accentramenti consistenti e di quelli privati a consorzarsi o ad affidare ad altri, più attrezzati (modello “*hub and spoke*”), l'esecuzione di una parte più o meno consistente del repertorio analitico. Inoltre, diviene sempre più diffusa nel territorio la presenza dei centri prelievo per migliorare il servizio ai cittadini. Il tempo e le modalità di trasporto a distanza dei campioni biologici è fonte di potenziale corruzione della matrice che genera errori preanalitici di varia natura e gravità. La mancanza a livello italiano di indicazioni univoche di comportamento, ha indotto la Federazione Italiana delle Società della Medicina di Laboratorio (FISMeLab) a costituire un gruppo di lavoro formato da rappresentanti delle diverse Società Scientifiche aderenti, con lo scopo di redigere un manuale di comportamento pratico sui requisiti di trasporto dei materiali biologici. L'idea guida è che le raccomandazioni comprendano i singoli misurandi nei vari am-

biti del Laboratorio, spingendosi anche alle fasi immediatamente precedente e successiva alla loro spedizione, senza però entrare in conflitto con i sistemi qualità dei singoli laboratori. Nella maggior parte dei casi l'utente potrà consultare una tabella dove troverà il nome del misurando e la raccomandazione di come trattarlo nel modo più affidabile dalla fine del prelievo all'inizio dell'analisi per non compromettere l'accuratezza della misura, considerando la temperatura di trasporto o l'eventuale necessità di separare il plasma/siero dalla parte corpuscolata, l'eventuale necessità di congelare il campione e a quale distanza di tempo dal prelievo. Le raccomandazioni descritte tengono conto delle migliori evidenze di letteratura disponibili, peraltro piuttosto disperse e non sempre univoche. Questa raccomandazione si divide in tante parti "speciali", una per ogni area del laboratorio: biochimica, ematologia, coagulazione, medicina trasfusionale, anatomia patologica, microbiologia, immunofenotipizzazione in citometria a flusso, citogenetica e genetica molecolare. Il tempo di trasporto è stato considerato una criticità. La raccomandazione cardine è di suddividerlo in due segmenti: al di sotto di 3 ore e oltre le tre ore dalla fine del tempo di prelievo. Si raccomanda che il tempo di prelievo sia contenuto in due ore e che l'attesa del mezzo di trasporto sia la più breve possibile.

(Per citare questo articolo: Miconi V, Brando B, Clerici P, Crivelli F, Curcio F, Giardini R, et al. Raccomandazioni della Federazione Italiana delle Società di Medicina di Laboratorio (FISMeLab) per il trasporto del materiale biologico. Riv Ital Med Lab 2019;15:70-82. DOI: 10.23736/S1825-859X.19.00007-0)

Parole chiave: Conservazione del materiale biologico; Rischio biologico; Linee guida e raccomandazioni.

ABSTRACT

In recent years the transport of biological samples has become a strategic theme. Their movement from a rare event has become a frequent practice due to the tendency of public laboratories to move towards consistent centralizations and of private laboratories to join or to entrust to others, bigger or more equipped ("hub and spoke" model), to process a substantial part of the analytical repertoire. Moreover, the presence of the sampling centers becomes more numerous and more widespread in the territory to improve the service to the citizens. The time and the way of remote transport of biological samples is a source of potential corruption of the matrix that generates preanalytical errors of various kinds and severity. The lack of unequivocal indications of behavior in Italy has prompted the Italian Federation of Laboratory Medicine Societies (FISMeLab) to set up a working group made up of representatives of the various participating Scientific Societies, with the aim of drafting a manual of practical behavior on the transport requirements of biological materials. The leading idea is that the recommendations include the individual measurands in the various areas of the laboratory, also covering the steps immediately before and after their shipment, without however conflicting with the quality systems of the individual laboratories. In most cases the user can consult a table where he will find the name of the measurand and the recommendation of how to treat it in the most reliable way from the end of the sampling at the beginning of the analysis in order not to compromise the accuracy of the measurement, considering the temperature of transport or any need to separate the plasma/serum from the corpuscular part, the possible need to freeze the sample and at what distance of time from the sample. The recommendations described take into account the best evidence of the available literature, which are rather scattered and sometimes ambiguous. These recommendations are organized into many "special" parts, one for each area of the laboratory: biochemistry, hematology, coagulation, transfusion medicine, pathology, microbiology, immunophenotyping in flow cytometry, cytogenetics and molecular genetics. Transportation time was considered a critical issue. It is recommended to divide it into two segments: less than three hours and more than three hours after the end of the withdrawal period. It is recommended that the withdrawal time be contained within two hours and that the waiting time of the transport be as short as possible.

Key words: Biological preservation; Biohazard release; Health planning guidelines.

La tematica del trasporto dei campioni biologici a scopo diagnostico è diventata ormai strategica dal momento in cui la loro circolazione, da evento raro (se non eccezionale), è divenuta prassi frequente.¹⁻⁵

La situazione può essere alquanto diversa in ambito pubblico rispetto a quello privato, ma la sostanza non cambia.

I laboratori pubblici tendono sempre di più a fare rete o andare verso accentramenti consistenti, quelli privati tendono sempre di più a consorziarsi o ad affidare ad altri, più attrezzati (*hub*), l'esecuzione di una parte più o meno consistente del proprio repertorio analitico.

In entrambi i casi è, inoltre, sempre più diffusa la prassi

di capillarizzare la presenza di centri prelievo per andare incontro al desiderio dei cittadini di non sottoporsi a grandi spostamenti per le proprie analisi di Laboratorio, soprattutto quando questo non rappresenta evento episodico e la loro età è avanzata.

Peculiare è, inoltre, il caso dei prelievi a domicilio, soprattutto quando chi effettua questo servizio non lo svolge con regolarità.

La distanza che il materiale biologico deve percorrere, un tempo confinato in ambito regionale, se non nella stessa provincia, lì dove questo è consentito dalle Autorità regolatorie, è sempre più grande andando oltre, in diversi casi, i confini nazionali.

Il tempo e le modalità di trasporto a distanza dei campioni biologici sono fonte di potenziale corruzione della matrice che genera errori di varia natura e gravità.

La preoccupazione di tenere sotto controllo questa fase del processo di Laboratorio è talvolta pari alla carenza di formazione sulla materia, con inevitabile disistima dei problemi e improvvisazione delle soluzioni (nei casi di test meno frequentemente richiesti).

Valgano due considerazioni in ambiti diversi del laboratorio.

Un problema rilevante, in ambito biochimico, è che la migliore procedura di conservazione di un misurando contrasta con quella di un altro. Purtroppo accade spesso che questi misurandi appartengano ad un unico campione, cioè sono processabili sulla stessa provetta. Questo comporta potenziale spreco di risorse, soprattutto quando il misurando che necessita di particolari attenzioni è uno solo mentre quelli che possono farne a meno sono molti. Esemplicativo è, al riguardo, il caso del glucosio la cui stabilità, in un campione non centrifugato, è non solo modesta, ma varia da soggetto a soggetto e, nel tempo, perfino nello stesso soggetto.

La difficoltà a destreggiarsi tra indicazioni diverse per una stessa procedura è ben illustrata, in ambito microbiologico, dal caso dei patogeni umani. Essi sopportano un ampio range di temperature di conservazione e trasporto, ma per un breve periodo di tempo.

Secondo alcuni autori, la temperatura di cui sopra più appropriata è di 0-4 °C, mentre altri suggeriscono addirittura -20 °C. Per non dire che in casi molto rari il trasporto del campione è addirittura sconsigliato come nel caso della ricerca dell'*Entamoeba histolytica* nelle feci o di coltura di parassiti in tale materiale.

Scopo della raccomandazione

La mancanza di indicazioni univoche, a livello italiano, di come comportarsi in questo ambito, ha scaturito la decisione della Federazione Italiana delle Società nel settore della Medicina di Laboratorio (FISMeLab) di costituire un gruppo di lavoro formato da rappresentanti delle diverse Società Scientifiche aderenti, con lo scopo di redigere una sorta di manuale di comportamento molto pratico su come far viaggiare i materiali biologici.

L'idea guida è che le raccomandazioni comprendano i singoli misurandi o i vari ambiti del Laboratorio, spingendosi anche alle fasi immediatamente precedente e successiva alla loro spedizione, non invadendo il campo, tuttavia, dei sistemi qualità dei singoli laboratori.

Le raccomandazioni descritte di seguito fanno capo alle migliori evidenze di letteratura disponibili, che peraltro non sono raccolte in modo omogeneo, anzi risultano francamente disperse.

Inoltre, l'originalità del presente lavoro consiste nel fatto che privilegia gli interessi del paziente e non quelli dell'operatore sanitario, nulla togliendo alle legittime esigenze di quest'ultimo, peraltro ben tutelato dal Contratto Collettivo Nazionale di Lavoro.

Modalità di utilizzo della raccomandazione

Nella maggior parte dei casi, l'utilizzatore potrà consultare una tabella dove troverà:

- il nome del misurando;
- la raccomandazione di come trattarlo nel modo più affidabile per non compromettere l'accuratezza della sua misura dalla fine del prelievo all'inizio dell'analisi, considerando i seguenti elementi:
 - la temperatura di trasporto;
 - l'eventuale necessità di separare il plasma/siero dalla parte corpuscolata;
 - l'eventuale necessità di congelare il campione (previa centrifugazione della relativa provetta) e a quale distanza dal prelievo.

Questa raccomandazione si divide in tante parti "speciali" per quante sono le aree del laboratorio.

Il tempo di trasporto è stato considerato una criticità. Si raccomanda di suddividerlo in due segmenti: al di sotto di tre ore e oltre le tre ore dalla fine del tempo di prelievo. Si raccomanda che il tempo di prelievo sia contenuto dalle ore 7:30 alle 9:30 e che l'attesa del mezzo di trasporto sia contenuta al massimo.

Nei casi in cui sia previsto che il lasso di tempo dalla fine di quello di prelievo all'arrivo in Laboratorio superi le tre ore, occorre centrifugare le provette di riferimento lì dove previsto da questa raccomandazione.

Il mancato rispetto del corretto contenimento dei tempi di prelievo rende problematico l'uso dei valori di riferimento di ciascun misurando, soprattutto in funzione del proprio ritmo circadiano.

Tale rispetto non vale solo per i pazienti ambulatoriali, ma anche per quelli ricoverati, per i quali questa pratica si inserisce all'interno delle incombenze del personale di cura della persona.

Dopo la centrifugazione del campione potrà essere necessario separare il siero/plasma per assicurarne l'integrità fino al momento dell'analisi. Talvolta alla separazione potrà essere necessario far seguire il congelamento. Vi sono

casi in cui la temperatura di conservazione del campione è così bassa (-70 °C) da far considerare il suo trasporto problematico.

La provetta ideale, in caso di centrifugazione fuori dal laboratorio (ad esempio nello stesso centro prelievi), è quella con gel separatore. Eliminare il contatto tra fase liquida e fase corpuscolata di un campione di sangue elimina, infatti, alla radice diverse fonti d'inesattezza. Sul banco degli imputati ci sono misurandi come il potassio o la lattico-deidrogenasi.

Le provette con gel separatore, quando il loro contenuto è destinato ad alcuni tipi di analisi, non dovrebbero essere congelate (-20 °C o meno) perché questa pratica può rivelarsi fonte di inesattezza analitica (ad esempio alcuni farmaci). In questi casi è opportuno far seguire, alla centrifugazione della provetta, la separazione del siero/plasma e quindi il successivo congelamento.

Vi sono matrici, come quella urinaria, che esigono l'invio sollecito al laboratorio affinché l'esame sia eseguito nel minor tempo possibile (due ore o meno). In alternativa è necessario assicurare l'immediata refrigerazione del campione e la realizzazione della catena del freddo fino al momento dell'analisi. Questa pratica non è esente da criticità, inficiando la valutazione di alcuni elementi del sedimento urinario (ad esempio alcuni cristalli).

L'impiego di provette per l'esame delle urine contenenti conservanti esclude la necessità di refrigerare i campioni. I limiti di tempo consentiti per una corretta valutazione, in tale caso, sono propri di ogni conservante e devono essere indicati dal Produttore.

Infine, nella parte di documento dedicata ai test genetici, è riportata una temperatura di trasporto, ritenuta non plausibile in altri ambiti, tra 10 °C e 30 °C. Da un punto di vista pratico si può concludere che le modalità di trasporto devono soddisfare i limiti più restrittivi, quando si allude alla temperatura ambiente, di 20±5 °C. Se invece il trasporto è unicamente di materiale destinato a test genetici, nulla osta al loro trasporto a temperatura tra 10 °C e 30 °C.

Considerazioni generali sul trasporto dei campioni in ambiti diversi del laboratorio

Emocitometria

Le indicazioni di letteratura sulle regole di conservazione e trasporto del sangue intero ad oggi non sono concordanti. Si raccomanda fortemente di non congelare il prelievo, né intenzionalmente né, soprattutto, accidentalmente per non causare l'emolisi degli elementi corpuscolati.⁶⁻¹⁰

Il tempo di trasporto è critico per gli elementi corpu-

scolati del sangue (leucociti, eritrociti, piastrine); il loro mantenimento in condizioni ottimali è limitato a 4-6 ore dal prelievo. Oltre questo termine inizia la corruzione della matrice con alterazioni dei leucociti (picnosi dei nuclei plurilobati, frammentazioni, vacuolizzazione del citoplasma dei monociti, fusioni dei granuli) e degli eritrociti (formazione di acantociti, aumento del volume globulare e diminuzione dell'MCHC). Questa evenienza provoca aggravii di lavoro per rigetti strumentali e/o allarmi morfologici dovuti alla difficoltà delle diverse tecnologie di classificare correttamente le sottopopolazioni leucocitarie e può essere causa di conteggi non accurati (frammentazione degli eritrociti e clasmatosi da citolisi che potrebbero interferire nei conteggi piastrinici).

L'incidenza e l'entità di questi errori, nel conteggio e nel riconoscimento delle cellule, possono essere legate alla filosofia analitica utilizzata e diverse in funzione delle varie tecnologie impiegate.

L'eventuale esecuzione dello striscio, prima della conta differenziale sui moderni emocitometri, costituisce fonte di aggravio dei carichi di lavoro costringendo ad eseguirlo su tutti i campioni e non solo su quelli per i quali risulta necessario. Tuttavia, nel caso in cui i tempi di trasporto eccedano le sei ore, lo striscio è indispensabile e se, nonostante questa precauzione, si osservano effetti da invecchiamento del campione, essi devono essere riconosciuti ed eventualmente riportati nel referto.

Il termine di 4-6 ore senza refrigerazione costituisce il tempo limite per il conteggio degli eritroblasti circolanti; se il tempo necessario per il trasporto eccede tale limite, il campione va refrigerato a 4-8 °C. I campioni nei quali sono potenzialmente presenti crioglobuline, e delle quali è richiesta la ricerca, devono essere mantenuti a 37 °C fino al momento dell'analisi.

Infine, in casi particolari come la ricerca del parassita malarico su goccia spessa, vale la stessa regola dell'emocromo: l'allestimento della stessa deve avvenire appena possibile dopo il prelievo. In alternativa, se i tempi di trasporto sono contenuti, si deve valutare la possibilità di invio dell'emocromo in toto, con il vantaggio di avere preparati più standardizzati e usufruire dei messaggi di allarme specifico che alcune tecnologie analitiche propongono.

Coagulazione

Le condizioni di conservazione e trasporto del sangue destinato a questo tipo di analisi sono peculiari e vanno rispettate fedelmente per ottenere risultati esatti.¹¹⁻¹³ Tuttavia, per questo settore sono presenti luoghi comuni che devono essere superati. Il caso più emblematico riguarda il

Tempo di Protrombina, o meglio la sua espressione come Ratio o INR (nel caso di terapia anticoagulante con dicumarolici). La attendibilità di questo test, infatti, senza refrigerazione del campione, ma conservato a temperatura di 18-24 °C, si spinge fino a 24 ore dal prelievo.

Medicina trasfusionale

In questo ambito valgono, per i test di Laboratorio, le stesse regole utilizzate per i pazienti che afferiscono ai servizi di medicina di laboratorio.¹⁴⁻¹⁹ Per indagini invece peculiari, valgono le istruzioni di questa guida, più avanti riportate.

Immunofenotipizzazione in citofluorimetria a flusso

I campioni di sangue periferico o agoaspirato midollare in EDTA, eparina o citrato destinati ad analisi immunofenotipiche in citometria a flusso possono essere mantenuti a temperatura ambiente e conservati per 12 ore (emorragia fetto-materna), 24 ore (*basophil activation test* [BAT]) e fino a 48 ore (*vasodilator-stimulated phosphoprotein* [VASP] e tutti i quesiti di immunopatologia e oncoematologia).²⁰⁻²⁹

Gli agoaspirati o scraping linfonodali in fisiologica, gli aspirati cavitari e i broncolavaggi alveolari devono essere prudenzialmente posti a +4-8 °C, specie se non è possibile il conferimento immediato al laboratorio.

L'analisi fenotipica del liquido cefalo-rachidiano richiede l'immediato processamento del campione, a causa dell'estrema delicatezza delle componenti cellulari presenti o in alternativa la conservazione nei tubi Transfix™ (Tabella I).

Citologia e istologia patologica

Questo settore della medicina di laboratorio vanta regole di conservazione e trasporto ormai consolidate che saranno il fondamento di questo ambito della raccomandazione.³⁰⁻³⁵

Analizzando alcune criticità, si sottolinea come i materiali freschi non fissati, devono essere recapitati al laboratorio tassativamente entro un'ora dal loro prelievo. In ambito citologico è raccomandato che il materiale strisciato o apposto sui vetrini sia completamente essiccato prima del trasporto. Grande cura deve inoltre essere posta nell'evitarne la rottura o danneggiamento. I contenitori del materiale inviato nei liquidi di fissaggio devono essere chiusi con grande cura, precauzione indispensabile in qualunque caso, pena l'impossibilità di ogni prosieguo analitico.

I campioni di tessuto per l'immunoistochimica devono essere inviati immediatamente in Laboratorio perché è utile/necessario procedere alla loro fissazione solo dopo le procedure preanalitiche proprie di tale diagnostica.

Batteriologia

In questo ambito, riguardo agli effetti della temperatura sulla corretta conservazione dei campioni durante il trasporto, va considerato il pericolo di eccesso di crescita della flora saprofita rispetto a quella patogena, soprattutto per tamponi effettuati sulla cute, la bocca, e l'apparato digerente in generale. In definitiva, da una errata conservazione/trasporto del campione può derivare maggiore difficoltà ad isolare i patogeni presenti al suo interno.³⁶

TABELLA I.—*Immunofenotipizzazione in citometria a flusso.*

Analisi	Tipo di campione	Anticoagulante	Temperatura	Nota
Immunofenotipizzazione cellulare sangue periferico	Sangue periferico	EDTA, Eparina, Citrato	Ambiente	48 h - Per tutti i test di immunopatologia e oncoematologia
Immunofenotipizzazione cellulare agoaspirato midollo osseo	Agoaspirato midollare	EDTA, eparina, citrato	Ambiente	48 h - Per diagnosi all'esordio e per follow-up, inclusa malattia minima residua
Immunofenotipizzazione cellulare agoaspirato linfonodale o ghiandolare	Agoaspirato tessuto solido	Nessuno, fisiologica	+2 °C/+8 °C	4 h - Eparinare se elevata contaminazione ematica
Immunofenotipizzazione cellulare liquidi da aspirati cavitari	Aspirato	Nessuno	+4 °C	12 h - Liquido pleurico, pericardico, peritoneale, sinoviale
Immunofenotipizzazione cellulare liquido cefalo-rachidiano	Aspirato	Nessuno	Ambiente	Immediato - Se impossibile analisi immediata, porre in tubi Transfix™ per max. 18 h
Analisi fenotipica cellule del broncolavaggio alveolare	Broncolavaggio	Nessuno	Ambiente	Immediato - Se impossibile analisi immediata, porre a +4 °C per max. 4 h
Analisi VASP e altri test fenotipici piastrinici	Sangue periferico	Eparina	Ambiente	48 h - Non agitare, Non usare posta pneumatica, Non refrigerare
Per emorragia fetto-materna	Sangue periferico	EDTA, eparina	Ambiente	12 h - Porre a +2 °C/+8 °C se oltre 12 h; max. 48 h
BAT Test - attivazione basofili con allergeni <i>in vitro</i>	Sangue periferico	Eparina	Ambiente	24 h - Non agitare

Biologia molecolare

Scopo delle corrette procedure di conservazione e trasporto, in questo settore, è quello di minimizzare il rischio di perdita o contaminazione degli acidi nucleici che si intende esaminare. Nel caso di un loro degrado, ad esempio, saranno inevitabili errori di quantificazione e/o recupero.

Sangue periferico e midollare per indagini molecolari e citogenetiche

I campioni raccolti in acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) o in destrosio citrato acido (ACD) non devono mai essere congelati per evitare l'emolisi. La fuoriuscita dell'eme dai globuli rossi, che ne conseguirebbe, è un potente inibitore della reazione a catena della polimerasi.

L'eparina ha un effetto analogo all'eme e, quindi, non può essere utilizzata come anticoagulante per tali indagini.

In caso di lunghi trasporti a distanza di campioni da sottoporre a indagini sull'RNA, è opportuno utilizzare additivi particolari, ormai disponibili sul mercato.

Per le indagini citogenetiche, in particolare, i campioni devono essere raccolti in provette contenenti litio eparina.

Miscellanea

Campioni raccolti su carta da filtro

Quando si utilizza la carta da filtro per raccogliere campioni destinati all'analisi del DNA, occorre assicurare un tasso di umidità utile a rallentare il suo essiccamento, evitando anche contaminazioni che ne comprometterebbero l'integrità.

DNA e RNA estratto

I campioni di DNA purificato dovrebbero essere conservati e trasportati a temperature al di sotto di quella di congelamento dell'acqua, per minimizzare l'attività degradante delle desossiribonucleasi. A temperature al di sotto dei -20 °C i campioni possono essere conservati fino a sette anni.

I campioni di RNA, a prescindere dal tempo di conservazione e trasporto, devono essere conservati a -70 °C o a temperature anche inferiori, perché le Ribonucleasi continuano a degradarli anche a temperature <-20 °C. L'RNA purificato è ancora più delicato e si conserva meglio se la precipitazione avviene in etanolo e la temperatura di conservazione è <-70 °C. In entrambi i casi, il trasporto di campioni destinati ad analisi dell'RNA appare problematico perciò deve avvenire rigorosamente secondo le modalità previste dal laboratorio specializzato ricevente.

Trasporto dei campioni per analisi biochimiche ed ematologiche

Le indicazioni riportate di seguito si riferiscono a campioni il cui trasporto deve essere effettuato oltre le tre ore dalla fine del tempo di prelievo.

Preparazione dei campioni per il trasporto¹⁻⁵

Tutti i campioni di siero/plasma devono essere centrifugati, prima della spedizione, a 1500×g per 10 minuti, dopo il completamento della fase di coagulazione ematica con formazione del coagulo (circa 20-30 minuti dal prelievo) e comunque entro 45 minuti dal prelievo.

Nei pazienti in terapia anticoagulante orale deve essere verificata, mediante ispezione visiva, la adeguata retrazione del coagulo (più lenta).

Al termine della centrifugazione procedere come di seguito indicato:

- provette di siero con gel separatore: verificare che il gel si sia posizionato tra la parte corpuscolata (rossa in basso) e il siero e riporre le provette nel corrispondente stativo di trasporto; nel caso il gel non si sia posizionato in modo corretto, la provetta deve essere nuovamente centrifugata;
- campioni di plasma o di siero da congelare: il plasma/siero surnatante deve essere prelevato (con una pipetta Pasteur) e trasferito in provette per aliquota di volume prestabilito. Le provette devono essere tappate, etichettate con l'etichetta corrispondente all'esame da congelare e, infine, congelate. I campioni devono essere mantenuti congelati fino all'esecuzione dell'analisi. I campioni di urine da congelare devono essere travasati in provette per urina già identificate con l'etichetta corrispondente all'esame specifico e, successivamente, congelati.

Precauzioni

1. Congelare solo plasma o siero, non congelare campioni di sangue intero, ad eccezione di alcuni misurandi (v. Tabella delle Specifiche dei Misurandi);
2. non congelare più volte un campione biologico;
3. separare e congelare i campioni di plasma (in citrato di sodio) per i dosaggi di coagulazione speciale (fattori della coagulazione, per studio dei marcatori di trombofilia) e per il dosaggio dei misurandi indicati nella Tabella delle Specifiche dei Misurandi;
4. non centrifugare o congelare, bensì mantenere a temperatura ambiente, i campioni per:
 - esame emocromocitometrico, gruppo sanguigno, Test di Coombs, tipizzazione linfocitaria, resistenze osmotiche, emoglobina glicata, ricerca emoglobine patologiche (v. Tabella delle Specifiche dei Misurandi);

- PT, aPTT, fibrinogeno, D-dimero, antitrombina. (v. Tabella delle Specifiche dei Misurandi);

5. trasportare i campioni in posizione verticale, con il tappo in alto negli appositi porta-provette.

Se non è richiesto il congelamento, i campioni devono essere trasportati ad una temperatura compresa tra +15 e +25 °C per i dosaggi su siero e plasma dopo opportuna centrifugazione. La fase di centrifugazione è obbligatoria.

In attesa del trasporto presso i laboratori *hub*/punti prelievo remoti, conservare:

- a temperatura +2-8 °C (all'interno di armadi refrigerati/frigoriferi), al riparo dalla luce solare diretta e da fonti di calore dirette, i campioni centrifugati e non soggetti a congelamento. Inviare presso i laboratori *hub* entro la giornata del prelievo;
- in frigorifero (a +4-8 °C) i campioni microbiologici;
- ad almeno -20 °C le aliquote di siero e plasma per misurandi instabili (v. Tabella delle Specifiche dei Misurandi).

Imballaggio e trasporto dei campioni

Devono essere previste differenti tipologie di situazioni/campione:

- 15-25 °C;
- almeno -20 °C;
- temperatura ambiente per campioni da trasportare in contenitore termico a 37±1 °C (es. crioglobuline).

Verifiche da eseguire prima della partenza dei campioni

Al termine dell'attività di prelievo e prima della partenza occorre verificare che:

- non ci siano campioni sulle postazioni di lavoro dell'area prelievi;
- non ci siano campioni all'interno dei frigoriferi;
- non ci siano campioni privi di etichette;
- eventuali pazienti accettati in ritardo siano correttamente trattati e i campioni aggiunti ai contenitori di trasporto;
- sia correttamente segnalata l'eventuale mancata consegna di campioni di urina da parte dei pazienti;
- tutte le provette siano chiuse correttamente;
- tutti i contenitori siano chiusi correttamente.

Misurandi per i quali le urine devono viaggiare al buio

- Coproporfirine;
- porfirine totali;
- uroporfirine.

Le indicazioni riportate di seguito si riferiscono a campioni il cui trasporto deve essere effettuato entro tre ore dalla fine del tempo di prelievo.

Qualora il centro prelievi non disponga di centrifuga, e di conseguenza i campioni biologici non possano essere centrifugati prima del trasporto, dovranno essere adottate modalità operative che garantiscano trasporti a temperature e tempi definiti e monitorati per garantire la stabilità del campione, relativamente agli analiti da misurare.

Sulla base di dati presenti in letteratura, si possono suggerire le seguenti modalità operative.

Trattamento dei campioni

Dopo il prelievo ed in attesa del trasporto, tutti i campioni di siero/plasma/urine sui quali andranno misurati analiti stabili in condizioni refrigerate (v. Tabella delle Specifiche dei Misurandi) dovranno essere mantenuti in frigorifero (2-8 °C), collocati su appositi porta-provette in modo che siano mantenuti in posizione verticale.

Preparazione dei contenitori per il trasporto

Il trasporto deve essere effettuato utilizzando gli idonei contenitori terziari coibentati e i contenitori secondari previsti dalla normativa vigente.

Le condizioni di temperatura idonee al trasporto (15-25 °C) potranno essere ottenute, per esempio, mediante l'utilizzo di piastre eutettiche con caratteristiche adeguate, che devono essere mantenute, prima del trasporto, nelle condizioni refrigerate previste dal produttore. In tal caso il numero delle piastre eutettiche per ogni contenitore terziario (considerando che all'interno possono essere collocati sino a due contenitori secondari) è pari a tre piastre di dimensioni idonee.

I campioni, al momento della partenza del trasporto, andranno trasferiti dal frigorifero dove sono stati collocati in attesa, al contenitore secondario che a sua volta andrà inserito nel contenitore terziario opportunamente preparato. Prima della chiusura del contenitore, dovrà essere collocata in posizione adatta (non in contatto con le piastre eutettiche) una sonda che registri in continuo le condizioni di trasporto relativamente alla temperatura e al tempo (dalla partenza dal centro prelievi fino all'arrivo al laboratorio di destinazione). Per ogni contenitore trasportato dovranno essere registrate le seguenti informazioni minime:

- centro prelievi;
- operatore responsabile;
- targa del mezzo;
- temperatura e tempo del trasporto.

Al momento dell'arrivo, il personale addetto al ricevimento prenderà in carico il contenitore e verificherà, o attraverso sistemi manuali di lettura della sonda o tramite collegamento con sito web specifico (qualora il mezzo di

trasporto sia dotato di trasmissione in radiofrequenza), le condizioni di trasporto. In generale sono considerati idonei i trasporti con tempi di percorrenza medi:

- <2 ore e temperature comprese tra 15 °C e 25 °C
- <a 180 minuti e temperature comprese tra 10 °C e 30 °C.

Qualora si registrino condizioni non conformi (tempo >3 ore indipendentemente dalle condizioni di temperatura; temperatura <10 °C o >30 °C indipendentemente dal tempo) i campioni appartenenti a quel trasporto andranno segregati e i responsabili del laboratorio, in relazione agli specifici test richiesti, valuteranno l'opportunità o meno di inserirli nel processo analitico. Dovrà essere di conseguenza approntata una procedura per la gestione delle non conformità ed un sistema di indicatori della qualità del trasporto (Materiale Digitale Supplementare 1: Tabella Supplementare I).

Trasporto dei materiali per anatomia patologica

Generalità

Per fornire una diagnosi anatomopatologica (sia istopatologica che citologica) adeguata e completa il tessuto o le cellule in esame devono essere conservati in modo ottimale. Tuttavia, dal momento in cui il campione è esciso dal paziente sino al momento in cui è adeguatamente trattato per poterne ottenere preparati istologici o citologici, sia l'architettura del tessuto (istologia), che le caratteristiche morfologiche (citologia) e biologiche (acidi nucleici e proteine) delle cellule che lo compongono, possono andare incontro a processi di degradazione e di alterazione. Questo processo degradativo deve essere adeguatamente controllato perché può limitare o addirittura impedire la diagnosi. Storicamente, e da gran tempo, sono state messe a disposizione degli Esperti metodiche di fissazione o congelamento che si ripromettono di ovviare al degrado del campione, mentre negli ultimi anni si è visto che anche la tempestività della pratica di queste metodiche gioca un ruolo cruciale nella corretta conservazione del campione.

La conservazione dei campioni citologici, biotici e chirurgici diventa quindi prioritaria al fine di garantire una diagnosi corretta e completa, ancor più in questi ultimi anni ove situazioni di criticità sempre più frequenti (distanza tra luogo di prelievo e luogo di lavorazione dei campioni, difficoltà di trasporti tempestivi) possono mettere in gioco l'efficacia. Si è visto quindi che occorre garantire anche una tracciabilità del campione dal momento del prelievo e durante tutto il ciclo lavorativo.

I punti critici di questo processo di conservazione es-

senzialmente riguardano quindi raccolta e trasporto del campione e tracciabilità del campione per i prelievi per esame istologico e per esame citologico.

Prelievi per esame istopatologico o istologico

L'esame istologico è volto alla definizione della patologia dei tessuti a scopo di diagnosi e di cura: per fornire una diagnosi adeguata occorre che il tessuto resecato (frammenti di tessuti — biopsie — o organi o loro parti asportati mediante intervento chirurgico — resezione) sia trasportato e conservato in modo adeguato.

Prelievi per consulenza intraoperatoria

La consulenza intraoperatoria è volta a definire la natura di un tessuto patologico, l'estensione di una lesione, la stadiazione di un tumore, l'adeguatezza di un'exeresi durante un intervento chirurgico. Il tessuto da esaminare deve essere inviato al laboratorio di lavorazione "fresco" ossia non immerso in liquido fissativo e nel più breve tempo possibile.

Prelievi per esame citologico

L'esame citologico è volto alla definizione della natura delle cellule prelevate a scopo di diagnosi e cura: le cellule da esaminare possono essere esfoliate da liquido biologico (urine, versamenti), ago-aspirate con ago sottile o asportate per abrasione dai tessuti. L'invio delle cellule o dei vetrini su cui le cellule sono strisciate o apposte deve avvenire con metodiche che ne garantiscano la conservazione adeguata (in fissativo o a secco).

Altri esami

Esami ultrastrutturali, immunistochimici, molecolari e di citometria a flusso sono applicati sui campioni sopra descritti.

Corretta raccolta, conservazione e trasporto di campioni di cellule e tessuti per diagnosi anatomopatologica del materiale

Le procedure per la corretta conservazione del materiale iniziano al momento dell'escissione dei campioni dall'organismo umano. Le modalità di raccolta e il trasporto di campioni alla struttura operativa di Anatomia Patologica sono fondamentali per garantire la stabilità delle componenti strutturali e biologiche del tessuto asportato. Come indicato da numerosi studi, il tempo di ischemia, le modalità di conservazione durante la raccolta e il trasporto possono deteriorare irrimediabilmente le caratteristiche molecolari del tessuto.

Il tempo d'intervento chirurgico noto come "tempo di ischemia calda" può influire sulla preservazione dell'integrità di molecole e sul profilo metabolico attraverso processi di acidosi e di degradazione enzimatica. Le linee guida dell'Association of Clinical Oncologists (ASCO) e del College of American Pathologists (CAP) indicano la necessità di monitorare il tempo d'intervento per una migliore conservazione di antigeni tissutali. Linee guida sulla qualità in anatomia patologica raccomandano di inserire nella richiesta per esame istologico del campione l'orario di somministrazione dell'anestesia, di legatura dei vasi maggiori, di rimozione del pezzo chirurgico dal paziente. Analogamente è raccomandato indicare l'orario di effettuazione di prelievi biotici.

Il tempo che intercorre tra l'escissione e la fissazione del tessuto è indicato come "tempo di ischemia fredda" e viene segnalato per gli effetti deleteri sulla preservazione di antigeni ed acidi nucleici. Le linee-guida americane del CAP/NSH (National Society for Histotechnology) elencano il tempo di ischemia fredda come campo obbligatorio nella check-list della richiesta di esame istologico, così come le linee guida ASCO/CAP per l'esecuzione di analisi immunoistochimiche a scopo predittivo nel carcinoma della mammella. Linee guida europee per indagini molecolari su tessuti sottolineano l'importanza del tempo di ischemia fredda sull'esito dell'analisi.

In base a questi presupposti, per la conservazione ed il trasporto dei campioni sulla richiesta di esame istopatologico devono essere riportati obbligatoriamente, tra le altre indicazioni:

- tempo di intervento dall'incisione cutanea all'escissione chirurgica (ora inizio/ora fine intervento);
- orario di inserimento del campione tissutale nel mezzo di conservazione/trasporto.

La maggior parte dei campioni inviati al trasporto per esami istocitopatologici sono irriproducibili e, pertanto, è necessario attivare tutte le procedure a tutela del paziente, che permettano il processamento del tessuto e la successiva diagnosi.

Ad esclusione dei prelievi che vengono inviati per consulenza intraoperatoria e di quelli per esame citologico, per la raccolta (e come mezzo di trasporto) di tessuti derivati da interventi chirurgici e biopsie nelle sale operatorie e negli ambulatori di prelievo biotico (endoscopico, radiologico, ginecologico) viene di norma usata la formalina, nome della soluzione acquosa della formaldeide o aldeide formica, con cui il composto viene commercializzato.

La formalina è il fissativo per eccellenza dei tessuti prelevati per diagnosi anatomopatologica, poiché mantiene

inalterata la morfologia cellulare e l'architettura del tessuto. Inoltre la maggior parte degli anticorpi in commercio per indagini immunocitochimiche su tessuto viene prodotta per riconoscere siti antigenici la cui conformazione è modificata dalla fissazione in formalina. Linee-guida nazionali e internazionali raccomandano l'uso di formalina tamponata sia per esami istologici sia immunocitochimica e molecolari (mutazioni geniche). A oggi non è ancora disponibile una valida alternativa alla formaldeide come fissativo dei tessuti, risultandone indispensabile l'utilizzo e ferma restando l'applicabilità obbligatoria delle procedure preventive a tutela della salute dei soggetti esposti.

La formaldeide in anatomia patologica è usata come formalina neutra tamponata per prevenirne l'acidificazione dovuta alla tendenza a essere ossidata ad acido formico. La soluzione tamponata aumenta la formazione di formalina monomeric (glicole di metilene) come reagente di fissazione, che permette una penetrazione nei tessuti di circa 1 mm/ora e che produce una lenta fissazione, dovuta a un legame covalente dei gruppi carbossilici della formalina con proteine, glicoproteine, acidi nucleici e altre molecole. Tuttavia, l'alta solubilità in acqua della formalina determina un alto assorbimento da parte del muco del tratto respiratorio e delle prime vie aeree, specie naso e seni nasali. Evidenze scientifiche sufficienti hanno definito una presunta azione come cancerogeno del distretto nasofaringeo, dei seni paranasali e, in modo controverso, delle leucemie mieloidi.

Con il Regolamento UE n. 895/2014 è stato precisato che la formaldeide risponde ai criteri di classificazione come sostanza cancerogena (categoria 1B). La nuova classificazione, operativa dal 1° aprile 2015, comporta la necessità di considerare il rischio cancerogeno ai fini della gestione della salute e sicurezza anche con riferimento all'esposizione di formaldeide e comporta l'applicabilità anche per le lavorazioni che implicano l'utilizzo della formaldeide del D.lgs. 9 aprile 2008 n. 81. Tra queste lavorazioni sono state evidenziate, in alcuni piani regionali di Prevenzione e Promozione della Salute, le esposizioni ambientali in sale operatorie e ambulatori durante la fase di riempimento dei contenitori per campioni biologici con formalina ed in laboratori di anatomia patologica durante le diverse fasi di manipolazione del tessuto.

Al momento attuale non esistono normative istituzionali specifiche, a livello nazionale, sulle modalità di raccolta e sul trasporto di tessuto e di cellule dall'ambiente di prelievo al laboratorio di anatomia patologica. Nel Manuale per la Sicurezza in Sala Operatoria: Raccomandazioni e Check-List del Ministero della Salute si raccomanda che le singole direzioni aziendali elaborino una procedura scritta

per la corretta modalità di trasporto intra- ed extra-ospedaliero del materiale biologico dalla sala operatoria al servizio di anatomia patologica, indicando la responsabilità e la tracciabilità del processo.

Si indicano di seguito le modalità consigliate per la raccolta, la conservazione ed il trasporto di campioni bioptici e chirurgici:

- a fresco: modalità obbligatoria per le consulenze intraoperatorie; per altri casi consigliata solo se le condizioni logistiche ed organizzative consentono un trasporto immediato dalla sede di prelievo al laboratorio di anatomia patologica;

- sottovuoto a 4-8 °C: l'uso del sottovuoto in sala operatoria permette l'eliminazione della formalina dall'ambiente. Il metodo sottovuoto può essere utilizzato per l'invio e il trasporto per qualsiasi campione di dimensioni uguali o maggiori a circa 1cm. La conservazione dei campioni freschi sottovuoto si basa sul principio della rimozione di ossigeno che limita la crescita della flora aerobica e permette la conservazione per un tempo sei volte superiore a quello della conservazione non sottovuoto. La procedura prevede che il campione asportato sia immediatamente sottoposto al sottovuoto con strumento dedicato e conservato a 4-8 °C durante il trasporto. In letteratura è riportato che, con tale procedura, è possibile conservare il tessuto in modo ottimale sino a 24 ore; un tempo di conservazione in sottovuoto di 48 ore a 4-8 °C garantisce ancora una buona vitalità delle cellule con conservazione delle caratteristiche istologiche e biologiche del tessuto. Tempi più lunghi non sono raccomandati;

- immersione in formalina: procedura raccomandata per le piccole biopsie. Esistono in commercio diversi sistemi che tendono a limitare la dispersione dei vapori di formalina durante l'immissione del campione nel liquido fissativo e nell'estrazione del campione stesso per il processamento (sostanze barriera unite alla formalina in contenitore precaricato; contenitore a doppio scomparto con possibilità di riversare la formalina presente in uno scomparto nell'altro scomparto ove è stato posato il campione). Per i campioni di dimensioni maggiori occorre procedere, in assenza di apparecchiature di messa in sottovuoto, sotto cappa aspirata. Le Linee Guida del Consiglio Superiore della Sanità del 2015 sottolineano la necessità di raggiungere l'impiego esclusivo di procedure alternative all'esposizione alla formalina, validate scientificamente, entro un periodo di tempo non superiore a 3 anni.

Le procedure di trasporto dei campioni raccolti e conservati come più sopra esposto devono garantire la tracciabilità del campione (tempo di trasporto) e la sua adeguata

TABELLA II.—*Anatomia patologica.*

Tipo di esame	Modalità di trasporto	Conservazione e processazione
Esame intraoperatorio	A fresco	Immediato
Esame citologico	Fissativo/a secco	Entro 24 ore
Biopsia	Formalina	Entro 48 ore
Pezzo operatorio	A fresco	Immediato
	Sottovuoto a 4-8 °C	Entro 24 ore
	Formalina	Entro 24-48 ore

conservazione. Il trasporto del campione tissutale sottovuoto deve garantire il mantenimento della temperatura a 4-8 °C (Tabella II).

Per il trasporto di materiale biologico occorre applicare le normative esistenti sulla sicurezza.

Trasporto dei materiali per esami microbiologici

Le indagini di Microbiologia clinica sono finalizzate alla definizione dello stato di malattia o di salute attraverso l'individuazione e la caratterizzazione di batteri, funghi, parassiti e virus quali possibili agenti patogeni ed alla ricerca e quantificazione degli specifici anticorpi.

Mentre le indagini sierologiche avvengono prevalentemente su campioni di siero o plasma, le indagini dirette, che possono essere di tipo colturale convenzionale, o basate su metodi immunologici (agglutinazione, immunocromatografia ecc.) vengono condotte su un'ampia varietà di materiali biologici.

Sugli stessi possono essere altresì condotte indagini mirate alla ricerca e quantificazione di specifiche catene di acidi nucleici.

Per quanto riguarda il trasporto dei campioni dal punto di prelievo al Laboratorio di Microbiologia, vanno fatte alcune considerazioni rispetto al tipo di patologia da indagare ed al relativo quesito diagnostico, al tipo di indagine da eseguire, al tipo di materiale e relativa sede anatomica di provenienza tenendo comunque presente che le variabili da gestire riguardano:

- tempo;
- temperatura;
- modalità e sistemi di trasporto.

Rispetto alla variabile tempo va inteso, in qualunque caso, che i campioni, quale che sia la loro tipologia ed origine, debbano pervenire al Laboratorio nel più breve tempo possibile.

Relativamente alle indagini sierologiche ed alle indagini genetiche rispetto alla variabile "tempo" e alle altre variabili valgono le indicazioni previste per tutte le altre indagini

ni dello stesso tipo, ed eseguite sullo stesso tipo di materiale, adottate nell'ambito della biochimica (vedi metaboliti, ormoni, Ab vari) e nell'ambito della genetica umana (materiali destinati alla ricerca di specifici acidi nucleici).

Per quanto riguarda le indagini relative alla ricerca di batteri e miceti le misure da adottare riguardano la necessità di conservare le caratteristiche di vitalità dei microrganismi da ricercare in funzione del fatto che il materiale derivi da distretti corporei normalmente "sterili" o da distretti normalmente "colonizzati".

Nel primo caso andrà garantita la vitalità del microrganismo salvaguardando il campione da contaminazioni esterne (vedi LCR, emocolture, pus, liquidi ecc.) ed in alcuni casi evitando la moltiplicazione batterica ai fini della interpretazione del risultato (vedi urinocolture) mentre nel secondo caso andrà ricercata una batteriostasi che impedisca la crescita dei colonizzanti, pur mantenendo la vitalità dell'eventuale patogeno presente (vedi tampone faringeo, feci ecc.).

Le modalità per ottenere l'effetto ricercato possono essere diverse e vanno dall'impegno di vari range di temperatura all'utilizzo di conservanti batteriostatici (es. acido borico, ecc.) o di specifici medium "di trasporto" spesso utilizzati con tampone.

Tempo e temperatura

I campioni biologici devono pervenire al Laboratorio il più rapidamente possibile per essere processati entro le 2 ore dal prelievo e comunque mantenuti in un intervallo di temperatura di 2-8 °C.

Il tempo del trasporto ed una temperatura inadeguata potrebbe infatti ridurre la vitalità di molti microrganismi (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* ecc.) o favorire la crescita di "contaminanti" o degli stessi patogeni modificandone la carica originale ed alterare l'interpretazione dell'esame.

In molti casi, ove sia possibile, il campione può essere prelevato anche con tamponi ed inserito in specifici terreni di trasporto.

Il terreno di trasporto ha la funzione di mantenere inalterate le caratteristiche chimico-fisiche del microrganismo, in quanto un adeguato pH previene fenomeni di disidratazione del materiale e processi di ossidazione ed autodigestione enzimatica, e biologiche in quanto garantisce un ambiente favorevole alla sopravvivenza dei microrganismi pur non favorendone la crescita.

I sistemi di prelievo con terreno di trasporto sono normalmente formati da un tampone per la raccolta del materiale e da una provetta, contenente un terreno di trasporto, dove viene inserito il tampone dopo il suo utilizzo.

Il tampone (*swab*) è costituito da un supporto (in plastica o metallico) dotato di fibre assorbenti naturali (cotone) o sintetiche (nylon, poliestere, Dacron, rayon, calcio alginato, ecc.), talvolta impregnate con carbone, siero o frazioni di albumina per migliorare la sopravvivenza dei microrganismi "esigenti" e per neutralizzare i metaboliti ad attività tossica. Le dimensioni (lunghezza e diametro) dei tamponi sono diverse in funzione del loro utilizzo.

Va tenuto presente che la natura della fibra è un elemento di criticità in funzione della tipologia di materiale o della ricerca da effettuare:

- tamponi in cotone, contengono acidi grassi ad azione tossica vs. molti microrganismi;
- tamponi in calcio alginato, rilasciano prodotti che interferiscono con la crescita di vari microrganismi (*Herpes simplex virus*, *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae*) e risultano tossici per le colture cellulari. Non sono idonei per estrazione di acidi nucleici mentre Dacron e rayon sono da considerarsi le fibre ideali.
- I terreni di trasporto comunemente utilizzati sono:
- terreno di Stuart o di Amies (liquido oppure in agar gel, con o senza carbone);
- terreno di Cary-Blair (in agar gel);

TABELLA III.—*Microbiologia.*

Campione	Conservazione
Sangue	Temperatura ambiente (inoculato in flaconi per emocoltura); se possibile incubare a 37 °C in specifico incubatore per emocolture
Essudati, drenaggi, liquidi (pericardico, pleurico, versamenti, dialisi peritoneale)	Inoculare parte del materiale nei flaconi per emocoltura e conservare a temperatura ambiente Conservare la restante parte a +2/+8 °C
Espettorato e/o broncoaspirato	+2/+8 °C
Tamponi in sistema di trasporto (faringeo, nasale, auricolare, vaginale, congiuntivale, cutaneo, ecc.)	Temperatura ambiente +2/+8 °C per ricerca <i>Campylobacter</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i>
Urine	+2/+8 °C
Feci	+2/+8 °C
Liquor	Temperatura ambiente (+2/+8 °C per ricerca virale)
Ricerca micobatteri	+2/+8 °C
Essudato (ulcere, piaghe, ferite chirurgiche)	+2/+8 °C
Biopsie, agoaspirati	+2/+8 °C, in fisiologica
Ricerca anaerobi in sistema di trasporto	Temperatura ambiente

+2/+8 °C: conservazione in frigo; temperatura ambiente: 20±5 °C).

TABELLA IV.—*Citogenetica e genetica molecolare.*

Tipologia campione	Finalità del test	Range di temperatura	Tempi
Sangue periferico	Cariotipo dopo coltura cellulare e/o estrazione acidi nucleici	20±10 °C	Entro 24-72 h dal prelievo
Sangue midollare	Cariotipo dopo coltura cellulare e/o estrazione acidi nucleici	20±10 °C	Entro 24 h dal prelievo
Liquido amniotico	Cariotipo dopo coltura cellulare e/o estrazione acidi nucleici	20±10 °C	Entro 24-72 h dal prelievo
Villi coriali	Cariotipo dopo coltura cellulare e/o estrazione acidi nucleici per analisi molecolari	20±10 °C	Entro 24-72 h dal prelievo
Biopsia cutanea	Cariotipo dopo coltura cellulare e/o estrazione acidi nucleici dopo coltura cellulare	20±10 °C	Entro 24-72 h dal prelievo
Cellule in coltura	Estrazione acidi nucleici diretta	20±10 °C	Entro 24-72 h dal prelievo
Sangue periferico o sangue midollare	Estrazione acidi nucleici per valutazione quantitative/qualitative in ambito onco-ematologico	20±10 °C	Entro 24 h dal prelievo

- terreni per anaerobi (in specifici set);
- tamponi per BM;
- tamponi per indagini virologiche.

Una particolare menzione va dedicata ai più recenti sistemi di trasporto e conservazione in fase liquida dove il materiale viene prelevato con tamponi floccati posti successivamente in un mezzo di trasporto liquido.

In questo caso le modalità di conservazione e di trasporto sono simili a quelle relative ai terreni gelificati, a tutto vantaggio della standardizzazione del prelievo e della fase analitica.

Il mezzo di conservazione diventa “materiale” a tutti gli effetti e può essere inserito in contesti di automazione della semina ottimizzando l’iter diagnostico.

I campioni vanno comunque predisposti alla conservazione e al trasporto come indicato dal laboratorio di microbiologia di riferimento e, generalmente, come indicato nella Tabella III e nel Materiale Digitale Supplementare 2 (Tabella Supplementare II).

Modalità di trasporto dei campioni biologici da sottoporre a test genetici (citogenetica e genetica molecolare)

Dato l’elevato grado di eterogeneità dei metodi analitici e dei campioni biologici utilizzati che caratterizzano i test genetici, vengono fornite indicazioni generali in base alla tipologia del campione da analizzare e alla finalità del test. Invece, per i campioni di sangue periferico/midollare per valutazione quantitative/qualitative di acidi nucleici in ambito onco-ematologico, che sono eseguite su sottopopolazioni cellulari, vengono indicati specifici intervalli di temperatura di conservazione e trasporto, diversi da quelli generalmente indicati nell’introduzione a tale riguardo.

Alcuni test eseguiti mediante Kit diagnostici a marchio CE/IVD potrebbero avere specifiche diverse da quelle indicate ed in tal caso occorre seguire le indicazioni specificate dal produttore.

È importante che al laboratorio, oltre al campione pervenga, in formato cartaceo/informatico, la richiesta con il quesito diagnostico, e per tutti i test genetici germinali anche il consenso informato all’esecuzione del test (Tabella IV).

Bibliografia

1. World Health Organization – Communicable Disease Surveillance and Response. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances; 2005 [Internet]. Disponibile alla pagina: www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2005_22r%20.pdf [citato 4 aprile 2019].
2. International Organization for Standardization. Medical Laboratories – Requirements for Quality and Competence ISO 15189; 2012 [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://www.iso.org/standard/56115.html> [citato 4 aprile 2019].
3. Ministero Italiano della Salute. Circolare n. 3 dell’8 maggio 2003. Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici; 2003 [Internet]. Disponibile alla pagina: www.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_394_allegato.pdf [citato 4 aprile 2019].
4. International Air Transport Association. Packing Instruction 650 – Biological Substances category B; 2017 [Internet]. Disponibile alla pagina: www.iata.org/whatwedo/cargo/dgr/Documents/packing-instruction-650-DGR56-en.pdf [citato 4 aprile 2019].
5. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2007–2008; 2007 [Internet]. Disponibile alla pagina: www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2007_2.pdf [citato 4 aprile 2019].
6. CLSI. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; Approved Guideline – Fifth Edition. CLSI document H21-A5. Wayne, PA, USA, 2008.
7. CLSI. Procedures for handling and processing of blood specimens for common laboratory tests; Approved Guideline – Fourth Edition. CLSI document H18-A4. Wayne, PA, USA, 2010.
8. CLSI. Urinalysis; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document GP16-A3. Wayne, PA, USA, 2009.

9. CLSI. Quality Control of Microbiological Transport Systems; Approved Standard – Second Edition. CLSI document M40-A2. Wayne, PA, USA, 2014.
10. Vaught JB, Henderson MK. Biological sample collection, processing, storage and information management. IARC Sci Publ 2011;(163):23–42.
11. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. Int J Lab Hematol 2009;31:462–7.
12. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. Thromb Haemost 2008;99:416–26.
13. Zaninotto M, Tasinato A, Padoan A, Vecchiato G, Pinato A, Sciacovelli L, et al. An integrated system for monitoring the quality of sample transportation. Clin Biochem 2012;45:688–90.
14. Dakappagari N, Zhang H, Stephen L, Amaravadi L, Khan MU. Recommendations for clinical biomarker specimen preservation and stability assessments. Bioanalysis 2017;9:643–53.
15. Zaninotto M, Tasinato A, Vecchiato G, Legnaro A, Pinato A, Plebani M. Performance specifications in extra-analytical phase of laboratory testing: sample handling and transportation. Clin Biochem 2017;50:574–8.
16. Haslachner H, Szekeres T, Gerner M, Ponweiser E, Repl M, Wagner OF, et al. The effect of storage temperature fluctuations on the stability of biochemical analytes in blood serum. Clin Chem Lab Med 2017;55:974–83.
17. Imeri F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M, Risch GM, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. Clin Chim Acta 2008;397:68–71.
18. Canadian Standard Association – CSA Group. Primary sample collection facilities and medical laboratories – Patient safety and quality of care – Requirements for collecting, transporting, and storing samples. Z316.7-12 reaffirmed 2017; 2017 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://store.csagroup.org/ccrz_ProductDetails?sku=Z316.7-12&cclcl=it_IT [citato 4 aprile 2019].
19. Mayo Medical Laboratories. Dangerous Goods Training [Internet]. Disponibile alla pagina: <https://news.mayomedicallaboratories.com/2017/06/29/dangerous-goods-training/> [citato 4 aprile 2019].
20. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. Br J Haematol 2011;155:30–44.
21. Ramström S, Södergren AL, Tynngård N, Lindahl TL. Platelet function determined by flow cytometry: new perspectives? Semin Thromb Hemost 2016;42:268–81.
22. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom 2010;78:211–30.
23. de Jongste AH, Kraan J, van den Broek PD, Brooimans RA, Bromberg JE, van Montfort KA, et al. Use of TransFix™ cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage. Cytometry B Clin Cytom 2014;86:272–9.
24. Davis BH, Dasgupta A, Kussick S, Han JY, Estrellado A; ICSH/ICCS Working Group. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part II - preanalytical issues. Cytometry B Clin Cytom 2013;84:286–90.
25. Johansson U, Bloxham D, Couzens S, Jesson J, Morilla R, Erber W, et al. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the use of multicoulour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. Br J Haematol 2014;165:455–88.
26. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. Cytometry B Clin Cytom 2016;90:26–30.
27. European LeukemiaNet. ELN – WP10 – Consensual recommendations on preanalytical precautions for the immunophenotyping of leukemia and immunoproliferative disorders; 2005 [Internet]. Disponibile alla pagina: www.leukemianet.org/sites/leukemia-net/content/e62/e846/e5819/e5821/infoboxContent5823/WP10preanalytical.pdf [citato 4 aprile 2019].
28. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood 2018;131:1275–91.
29. Porra V, Bernaud J, Gueret P, Bricca P, Rigal D, Folléa G, et al. Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method: evaluation of the Fetal Cell Count kit. Transfusion 2007;47:1281–9.
30. Lott R, Tunnicliffe J, Sheppard E, Santiago J, Hladik C, Nasim M, et al. Pre-microscopic examination specimen handling guidelines in the surgical pathology laboratory; 2014 [Internet]. Disponibile alla pagina: http://webapps.cap.org/apps/docs/proficiency_testing/pre-examination.pdf [citato 4 aprile 2019].
31. National Institutes of Health – Biospecimen Working Group. Guidelines for human biospecimen storage and tracking within the NIH Intramural Research Program; 2013 [Internet]. Disponibile alla pagina: https://oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/sourcebook/documents/ethical_conduct/guidelines-biospecimen.pdf [citato 4 aprile 2019].
32. Dash RC, Robb JA, Booker DL, Foo WC, Witte DL, Bry L. Biospecimens and biorepositories for the community pathologist. Arch Pathol Lab Med 2012;136:668–78.
33. US National Research Council. Review of the Formaldehyde Assessment in the National Toxicology Program 12th Report on Carcinogens. Washington, DC: The National Academies Press; 2014.
34. Zarbo RJ. Histologic validation of vacuum sealed, formalin-free tissue preservation, and transport system. Recent Results Cancer Res 2015;199:15–26.
35. Istituto Superiore di Sanità. Spedizione di materiale biologico o altro materiale rilevante per la ricerca scientifica; 2000 [Internet]. Disponibile alla pagina: http://old.iss.it/binary/prev/cont/ISPGMBGE01_001_Spedizione_materiali_biologici.pdf [citato 4 aprile 2019].
36. Manoni F, Caleffi A, Gessoni G, Alessio MG, Lippi G, Valverde S, et al. L'esame delle urine chimico morfologico e colturale: proposta di linee guida per una procedura standardizzata della fase preanalitica. Riv Ital Med Lab 2011;7:25–35.

Conflitti di interesse.—Gli autori dichiarano di non aver alcun conflitto di interesse.

Studi condotti su esseri umani e animali.—L'articolo non contiene alcuno studio eseguito su esseri umani e su animali da parte degli autori.

Consenso informato.—Per questo tipo di studio non è richiesto in consenso informato.

Publicato online: 4 aprile 2019. - Accettato: 14 dicembre 2018. - Ricevuto: 17 ottobre 2018.

Per i materiali supplementari, si rimanda alla versione HTML di questo articolo su www.minervamedica.it