

Criteri di qualità per l'accettabilità dei campioni

M. Morandini

Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

Riassunto

La qualità del campione è condizione necessaria, anche se non sufficiente, per la qualità del risultato degli esami di laboratorio.

Recentemente 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. Sono stati proposti mezzi automatizzati per la valutazione dell'accettabilità del campione di siero.

Tuttavia una adeguata garanzia della qualità avviene solo attraverso un controllo esteso lungo la fase analitica e postanalitica 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.

Summary

Quality criteria for samples acceptability

The quality of biologic samples is a needed but not sufficient condition for the quality of laboratory results.

Recent international guidelines and recommendations, procedures for quality and performance control, and indicators of extra-analytical phase quality focused on the sample acceptability. Automatic tools for the assessment of "serum indices" have been proposed.

Nevertheless, adequate quality assurance of sample is assured only by the control of the analytical and post-analytical phases and by the cooperation between the Laboratory and other healthcare professionals, especially nurses. This is an essential task for the Laboratory Medicine professionals.

Criteri di accettabilità del campione

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 ottenuti¹.

Per questo motivo il laboratorio si avvale di standard e linee guida internazionali² (vedi anche capitolo 5.4 Pre-examination procedures in ISO 15189:2003; capitoli 5.7 Sampling, 5.8 Handling of test and calibration items in ISO/IEC 17025:2000; capitoli 7.5.2 Identification and traceability, 7.5.3 Customer property in ISO/DIS 9001 (E); capitoli 7.6 Sample collection, 7.7 Sample transport and handling, 7.9 Confidentiality and safety in EC4) per la stesura di procedure operative interne relative alla gestione dei campioni e la definizione di criteri di accettabilità per la valutazione dei requisiti necessari per assicurare qualità al campione primario.

Diversi studi riportati in letteratura^{1,3}, 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 frequente rifiuto del campione per non adeguatezza, e come l'accettazione di campioni compromessi provochino risultati e informazioni errate con possibili trattamenti terapeutici che causano eventi avversi sul paziente.

La valutazione della qualità del campione non è limitata alla fase della sua accettazione per l'analisi, ma la valutazione complessiva di idoneità del campione si ha, dopo averlo processato, in fase di validazione dei dati con il riscontro di risultati anomali associati ad allarmi strumentali relativi ai canali analitici e/o di dati del paziente non correlati con valutazioni trasversali.

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 labora-

torio, di campioni che non rispondono ai requisiti di adeguatezza, è la ri-lavorazione dei nuovi 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.

Utilizzare indicatori di qualità³, quali strumenti idonei per identificare e raccogliere informazioni su ogni caratteristica anomala che ha portato al rifiuto del campione relativamente alla modalità di raccolta, trasporto e conservazione del campione, e gestire in fase di validazione i dati discrepanti, verificando se vi sia stato scambio di pazienti o contaminazione del prelievo, comporta la verifica di una serie di azioni che coinvolgono più figure professionali (medico, infermiere, personale ausiliario) esterne al laboratorio. 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 le specifiche di qualità (limiti di accettabilità) del proprio laboratorio e sensibilizzare tutti gli operatori coinvolti sulle criticità e gestione della fase preanalitica con una azione proattiva di informazione e aggiornamento costante, e costruire procedure definite ed efficaci per un miglioramento continuo della qualità del processo di costruzione dell'informazione prodotta dal laboratorio.

Il monitoraggio continuo con indicatori di qualità del laboratorio secondo procedure standardizzate inizia già nel 1989 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*⁶ 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; inoltre, l'utilizzo da parte dei laboratori di questi indicatori di qualità permette il confronto oggettivo tra gli stessi.

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.

Con il QT3 sono valutati:

- Campioni smarriti/non ricevuti
- Campioni non etichettati
- Campioni etichettati in modo non corretto
- Campioni con richiesta e/o etichetta incomplete
- Campioni emolizzati
- Campioni coagulati
- Campioni con quantità insufficiente

- Variabilità inaccettabile (delta check) evidenziata nella validazione dei risultati
- Altre ragioni (tempo di consegna, trasporto, trattamento dei campioni).

Le CLSI GP26-A3² *Application of a Quality Management System Model for Laboratory Services; Approved Guideline-Third Edition* al punto 5 descrivono le diverse azioni richieste e le relative responsabilità della fase preanalitica - dalla richiesta esami, alla raccolta e trasporto del campione, al ricevimento in laboratorio e trattamento per l'analisi - le quali devono essere eseguite in modo accurato per il successo dell'intero processo di produzione dei risultati analitici.

Nelle CLSI EP7-A⁶ *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline* sono presenti indicazioni sulla gestione e valutazione delle interferenze endogene presenti del campione.

Il QT3 viene utilizzato quale indicatore del monitoraggio dell'efficienza delle linee guida per il controllo degli errori nella fase preanalitica e per implementarne la riduzione in relazione ai livelli di accettabilità definiti nel proprio laboratorio.

Gli "indici di siero"

In letteratura, la valutazione dell'adeguatezza del campione basata sull'applicazione degli indicatori di qualità della fase preanalitica e postanalitica, seppur nell'eterogeneità delle modalità di rilevazione e analisi dei risultati^{5,7,8,9} evidenzia la prevalenza di campioni emolizzati, quantità insufficiente, campioni coagulati, identificazione non corretta o incompleta, trattamento e/o modalità di trasporto del campione non corretta. L'emolisi è causa primaria per i campioni considerati non adeguati, prima ancora dell'esecuzione dell'analisi^{1,10}, per le correlate interferenze analitiche.

Lippi e Coll.¹¹ hanno rilevato come l'emolisi in vitro, seppur tendenzialmente evitabile, sia un fenomeno complesso, che dipende dalla tecnica di prelievo¹² (accesso venoso difficile, tipo di ago utilizzato, stasi da laccio, ostruzione parziale di cateteri, applicazione di pressione negativa da aspirazione con siringa), e dal trattamento del campione (esposizione a temperature calde o fredde, centrifugazione protratta ad alta velocità), in grado di produrre una interferenza sui principali parametri ematochimici (soprattutto enzimi di citolisi e potassio) dipendente dal grado dell'emolisi stessa e dal metodo analitico utilizzato come rappresentato in Tabella I.

È noto che la presenza di emolisi visibile (>0,3 g/L di emoglobina libera nel siero) è valutabile dopo sedimentazione del sangue intero o su campione centrifugato.

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

Tabella I. Influenza dell'emolisi nei test di routine di chimica clinica¹¹.

Analita	Bias desiderabile %	Emoglobina sierica libera							
		0,16 g/L	0,3 g/L	0,6 g/L	1,3 g/L	2,6 g/L	5,1 g/L	10,3 g/L	20,6 g/L
Albumina, g/L	±1,3	0,2%	0,4%	0,4%	0,6%	0,7%	0,7%	1,3%	3,1%
Fosfatasi alcalina, U/L	±6,4	0,2%	0,5%	1,0%	1,6%	4,8%	9,9%	18,7%	36,9%
Alanino aminotransferasi, U/L	±12,0	0,8%	3,2%	2,6%	3,0%	5,9%	8,1%	15,2%	26,1%
Aspartato aminotransferasi, U/L	±5,4	2,1%	5,6%	10,5%	17,3%	29,4%	45,5%	62,3%	77,0%
Bilirubina (totale), mmol/L	±10,0	0,3%	1,2%	1,0%	2,9%	3,0%	1,8%	3,3%	3,9%
Calcio, mmol/L	±0,8	0,3%	0,2%	0,3%	0,3%	0,4%	0,3%	0,3%	0,3%
Cloro, mmol/L	±0,5	0,0%	0,2%	0,4%	0,4%	0,6%	0,7%	0,9%	1,4%
Creatina kinasi, U/L	±11,5	1,1%	1,6%	3,4%	6,0%	11,6%	21,3%	36,2%	54,3%
Creatinina, mmol/L	±3,4	0,8%	0,8%	0,9%	0,7%	2,1%	2,8%	3,0%	3,6%
γ-Glutamiltransferasi, U/L	±10,8	2,5%	3,2%	3,4%	4,1%	6,0%	7,9%	10,2%	22,0%
Glucosio, mmol/L	±2,2	0,2%	0,1%	0,3%	0,1%	0,1%	0,3%	0,5%	0,7%
Ferro, mmol/L	±8,8	0,3%	0,7%	0,7%	1,0%	2,3%	5,0%	10,2%	20,7%
Lattato deidrogenasi, U/L	±4,3	4,4%	8,0%	14,4%	24,0%	37,7%	56,2%	69,8%	83,7%
Lipasi, U/L	±10,1	0,0%	0,3%	1,0%	3,8%	10,2%	15,8%	20,8%	23,0%
Magnesio, mmol/L	±1,8	0,2%	0,3%	0,7%	0,9%	1,1%	1,7%	3,3%	5,5%
Fosforo, mmol/L	±3,2	0,4%	0,6%	0,5%	0,9%	1,4%	2,7%	5,1%	9,9%
Potassio, mmol/L	±1,8	0,4%	0,7%	1,6%	3,0%	6,1%	11,8%	21,4%	36,1%
Sodio, mmol/L	±0,3	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%	0,7%	0,8%	1,3%	2,4%
Azoto ureico, mmol/L	±5,5	1,0%	1,1%	0,9%	0,7%	0,7%	1,6%	1,9%	4,3%
Acido urico, mmol/L	±4,8	0,3%	0,4%	0,4%	0,5%	0,7%	1,6%	2,6%	5,4%

Risultati comparati con le correnti specifiche di qualità per bias desiderabile

I sistemi di automazione totale della fase preanalitica integrata con quella analitica e il gran numero di campioni da processare, oltre all'etichettatura delle provette che limitano la visibilità del contenuto, rendono problematica l'osservazione diretta del campione per rilevare l'eventuale presenza di un interferente endogeno e valutazione immediata dell'adeguatezza del campione.

L'interferenza può essere misurata spettrofotometricamente dai sistemi analitici di biochimica di ultima generazione, denominati "indici di siero". Questa modalità oggettiva di rilevare gli interferenti associata a livelli decisionali di interferenza critici 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^{13,14} 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 comunicare al clinico il dato con richiesta contestuale di un campione di controllo per escludere l'ipotesi di emolisi in vivo¹¹.

La misura degli "indici di siero" per lipemia e ittero fornisce indicazione di ulteriore attenzione ai test biochimici in cui possono dare interferenze positive o negative. I campioni che presentano iperlipidemia (trigliceridi >900 mg/dL) possono essere ritenuti adeguati,

trattandoli con LipoClear® per chiarificare il siero rimuovendo i lipidi e riprocessando il surnatante per i test che davano segnalazione di interferenza¹⁵. L'indice di lipemia può essere influenzato da torbidità non correlata al quadro lipidico del paziente ma ad un trattamento terapeutico con emulsioni grasse, in tal caso è consigliabile effettuare il prelievo e analizzare il campione dopo 8 ore dalla fine della somministrazione.

Gli indicatori di qualità del campione "indici di siero", sono ottenuti da misure di assorbanza eseguite, dagli analizzatori di biochimica clinica, durante l'intero ciclo analitico di un dosaggio, e sono la somma del colore sviluppato dalla reazione e quello di alcune sostanze "assorbenti" (emoglobina, bilirubina e lipidi) proprie del campione di siero o plasma che a concentrazioni elevate possono dare interferenze di natura spettrofotometrica con conseguente sovrastima o sottostima del componente da misurare.

Ad esempio, il principio analitico utilizzato dall'analizzatore ADVIA®1650 Bayer per la rilevazione degli indici di siero (emolisi, bilirubina e ittero), è basato su letture bicromatiche di assorbanza per ciascun interferente, in cui la lunghezza d'onda principale è corrispondente al picco e la secondaria alla minima assorbanza misurata, con successivo calcolo del valore dell'assorbance mediana moltiplicato per un fattore di calibrazione ricavato sperimentalmente (a, b, c), e per un fattore di correzione specifico per ogni indice (d, e, f). I fattori di correzione sono impiegati per correggere la non specificità dell'assorbance dell'emolisi e dell'ittero,

Tabella II. Formule di calcolo dei fattori di calibrazione e indici di siero (ADVIA®1650 Bayer).

Indici	Lunghezza d'onda	Fattore specifico, dipendente da materiale di riferimento e metodo impiegato	Algoritmo
Lipemia	658/694 nm	Fattore $a = [\text{st lipemia}] / \text{Abs@LIPE (st)}$	Fattore $a \cdot \text{Abs @ LIPE (camp)}$
Emolisi	571/596 nm	Fattore $b = [\text{st emoglobina}] / \text{Abs@HEME (st)}$	Fattore $b \cdot \text{Abs @ HEME (camp)}$
Ittero	478/505 nm	Fattore $c = [\text{st bilirubina}] / \text{Abs@ICTE (st)}$	Fattore $a \cdot \text{Abs @ ICTE (camp)}$

Tabella III. Formule di calcolo dei fattori di correzione e indici di siero (ADVIA®1650 Bayer).

Indici	Assorbanza Abs @	Interferenti	Algoritmo con Fattore di correzione
Lipemia	658/694 nm	Abs@LIPE	Abs@LIPE
Emolisi	571/596 nm	Abs@EME + Abs@LIPE	Abs corretto@HEME = Abs@EME - fattore $d(1,1) \cdot \text{Abs@LIPE}$
Ittero	478/505 nm	Abs@ICTE + Abs@EME + Abs@LIPE	Abs corretto@ICTE = Abs@ICTE - [fattore $e(0,5) \cdot \text{Abs@HEME}$ - fattore $d(1,1) \cdot \text{Abs@LIPE}$] - fattore $f(2,5) \cdot \text{Abs@LIPE}$

come riportato schematicamente nelle Tabelle II e III. Il valore ottenuto dalle formule viene poi confrontato con una scala di sensibilità tarata e programmata.

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. Con questo metodo, la valutazione dell'accettabilità del campione e suo eventuale rifiuto avviene solo dopo averlo analizzato, con inconvenienti sia per il paziente sul processo di diagnosi e cura, sia sull'organizzazione del laboratorio con impegno di tempo legato alla comunicazione e registrazione della non idoneità da parte del tecnico o medico di laboratorio e alla rilavorazione dei campioni richiesti per controllo.

Tra i componenti biochimici più frequentemente analizzati (ALT, ALP, amilasi, bilirubina totale, CK, GGT, ferro, magnesio LDH, sodio, potassio), solo il potassio risente in modo significativo dell'influenza della temperatura. Stahl e Coll.¹⁶ hanno dimostrato che la concentrazione di potassio decresce con l'aumento della temperatura e viceversa; i componenti biochimici incluso il potassio sono stabili per 8 ore conservando il campione a 20°C e ciò permette di organizzare un adeguato trasporto del materiale biologico, verso il laboratorio, utilizzando contenitori termostatici secondo le nuove norme europee (UN Committee of Experts on the Transportation of Dangerous Goods, UN 3373 and ADR-S).

Campioni inadeguati in Ematologia e Coagulazione

Le cause di non accettabilità del campione in emato-

logia^{17,18} e coagulazione¹⁹ riguardano prevalentemente campioni coagulati, insufficiente quantità di sangue (rapporto anticoagulante e sangue non rispettato), non corretta etichettatura e/o identificazione del paziente e/o richiesta, campione emolizzato, campione diluito per contaminazione con infusioni, trasporto del campione in tempi e con modalità non adeguate.

Parte di queste cause possono essere evidenziate prima dell'analisi del campione: il campione coagulato può essere segnalato in fase preanalitica solo attraverso l'esame visivo della provetta, capovolta lentamente al fine di mettere in evidenza gli eventuali microcoaguli. Gli attuali sistemi automatici di preanalitica non consentono la rilevazione della inaccettabilità del campione. Anche il campione insufficiente può essere valutato visivamente: l'alterato rapporto anticoagulante/sangue influisce in modo significativo sui test della coagulazione (rapporto nominale 1:9) con variazioni dei risultati di PT e aPTT (aumento), mentre in ematologia comporta modificazioni osmotiche che influiscono sulle caratteristiche morfologiche dei leucociti.

Ma più frequentemente la non accettabilità del campione si rileva in fase di analisi (ostruzione della sonda dell'emocitometro per aspirazione di campioni coagulati, segnalazione di allarmi strumentali relativi al campione) e in fase di validazione dei risultati per variabilità inaccettabile (delta check) e dati del paziente non correlati con valutazioni trasversali²⁰.

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 aPTT dovrà essere determinato preferibilmente tra le 2 - 4 ore dal prelievo.

Per gli esami di ematologia e coagulazione il corret-

to utilizzo delle provette viene agevolato dalla distinzione per colore che corrisponde al contenuto in anti-coagulante e concentrazione predeterminata di EDTA di potassio e citrato di sodio, che comporta livelli minimi di rifiuto del campione per l'analisi.

Vi sono differenze importanti nella numerosità e tipologia di campione inadeguato nella pratica quotidiana, a seconda della provenienza dello stesso. E' stata rilevata¹⁷ una differenza tra campioni di sangue prelevato da infermieri di laboratorio e di reparto con minore incidenza di cause di non accettabilità per i primi dovuta alla maggior numerosità di prelievi, abilità ed esperienza delle tecniche di prelievo, maggior tempo dedicato al paziente e al minor *turnover* del personale.

Nella nostra esperienza differenze si rilevano tra campioni provenienti dal Dipartimento di Emergenza (Pronto Soccorso, Unità di Rianimazione e Terapia Intensiva) e pazienti di altri reparti. Nel primo gruppo vi è maggiore incidenza di campioni coagulati o emolizzati (pazienti con accessi venosi difficili, incompleta miscelazione di sangue e anticoagulante) e frequente è l'incompleta identificazione del paziente, al momento dell'accesso in ospedale, dovuta all'impossibilità di ottenere piena collaborazione alla sua identificazione se in stato confusionale e privo di documenti. Lo scambio pazienti¹⁸ è un evento rilevato dal laboratorio in fase di validazione tecnica dei risultati, e si presenta sia in Pronto Soccorso che nei reparti di Medicina Generale: nel primo caso per scambio di registrazione dei pazienti all'ingresso con attribuzione dell'identificativo di una persona all'altra con errata generazione di richiesta ed etichette del campione. Nei reparti di Medicina Generale l'evento scambio pazienti avviene per i ricoverati presenti nella stessa stanza e letti attigui o per casi di omonimia per non corretta identificazione della persona.

L'intervento del professionista di laboratorio in fase di validazione dei dati, con la verifica della plausibilità e accettabilità del campione, permette un utilizzo corretto dei risultati e contribuisce alla sicurezza del paziente.

La sempre maggior diffusione di sistemi analitici che utilizzano profili multipli e piccole quantità di campione, comportano l'utilizzo di contenitori con dimensioni ridotte e di conseguenza una riduzione del numero di provette da gestire da parte del personale infermieristico e della minor quantità di campione prelevato per persona che si traduce in un contenimento dell'anemia iatrogena (campioni di sangue) per i pazienti ricoverati²¹, e per il laboratorio la processazione e valutazione di un minor numero di contenitori, con aumento della sicurezza per la riduzione del materiale biologico da gestire e smaltire.

Fase preanalitica per gli esami delle urine

Per garantire risultati validi, il campionamento e la conservazione delle urine per l'esecuzione dei test analitici di tipo chimico, batteriologico ed esame microscopico, bisogna attenersi alle procedure descritte nelle

aggiornate *European Urinalysis Guidelines* 2000 (ECLM)²², che hanno ristrutturato quanto descritto nel NCCLS GP 16-T del 1992.

Gli errori occorsi nella fase preanalitica si rilevano nella fase di validazione dei dati, al riscontro di risultati discrepanti verso la plausibilità e/o le condizioni cliniche della persona.

Fattori critici sono la modalità di raccolta (detersione perineale, contenitori) e tipologia di campionamento che dipendono anche dal momento in cui viene richiesto l'esame: urgente o programmato.

Nella verifica della fase preanalitica dei campioni, con esame programmato, si riscontra l'utilizzo del campione *random* (raccolto in qualsiasi ora) per l'esame e la determinazione dei costituenti dell'urina (urine standard) invece delle "urine del primo mattino". Quest'ultimo viene considerato il campione ottimale per essere stato trattenuto in vescica per un periodo di 4 – 8 ore, come raccomandato dalle linee guida, quindi più rappresentativo per la concentrazione dei costituenti presenti e più sensibile per la rilevazione dell'eventuale presenza di batteriuria asintomatica, come ad esempio nelle donne gravide. La raccolta del campione di urine del primo mattino risulta essere più agevole per i pazienti ospedalizzati, mentre è più difficile per pazienti ambulatoriali sia per l'esecuzione non corretta sia per la poca comprensione della procedura. Ove la raccolta risulti idonea vi è partecipazione da parte della persona e un rapido trasporto del campione di urina in laboratorio.

I campioni ambulatoriali spesso sono raccolti come "secondo urine del mattino", dopo un riposo in vescica di 2 – 4 ore, in cui componenti possono subire l'influenza dell'ingestione di alimenti e del movimento.

L'adeguata informazione del paziente sulla modalità (per evitare contaminazioni con fluidi esterni ed interni: feci, mestruazioni, secrezioni vaginali e prostatiche) e tipologia di raccolta delle urine è fondamentale per l'adeguatezza del campione e per l'accuratezza dei risultati ottenuti dall'esame.

Necessaria è la segnalazione sulla richiesta della tipologia di raccolta del campione, *standard* oppure *random*, per la corretta interpretazione dei risultati.

Il campione *random* ha carattere di esame urgente e viene analizzato per valutare i sintomi suggestivi riferiti dal paziente che affersce al Pronto Soccorso. La modalità di raccolta è solitamente del mitto intermedio e spesso senza detersione perineale che può comportare contaminazioni dell'urina. Frequentemente viene eseguito un esame rapido utilizzando strisce reattive e con lettura visiva diretta da parte del personale infermieristico e/o medico del Pronto Soccorso, generalmente non formato sulla valutazione corretta dei risultati ottenuti che implica una conoscenza attenta della fase preanalitica. Il campione controllato in laboratorio, dove vengono utilizzati strumenti semiautomatici o automatici che garantiscono dati accurati, può dare risultati diversi con falsi positivi o falsi negativi per alcuni componenti²³.

Le cause di errore sono riconducibili: al tempo di lettura della striscia reattiva non rispettato; alla modalità non corretta di conservazione del flacone contenente le strisce reattive: spesso viene lasciato aperto, e determina falsi positivi per i nitriti, indicatori di batteriuria, e falsi negativi per la ricerca della presenza di sangue; al ritardo con cui l'urina viene trasportata in laboratorio: risulta impossibile determinare il tempo intercorso dalla minzione alla sua consegna, infatti l'unica indicazione di tempo è quella presente sull'etichetta identificativa della persona che corrisponde alla generazione della richiesta dell'esame, che spesso è di molto anteriore al momento in cui il campione arriva in laboratorio. Con il trascorrere del tempo tra la raccolta e la consegna dell'urina per l'analisi in laboratorio, può esservi una proliferazione batterica che comporta un aumento della positività del test per le proteine (ritenuto un indicatore della presenza di batteriuria) mentre falsi negativi si riscontrano in urine molto diluite (valutazione contro peso specifico) o acide (valutazione contro pH).

Le linee guida europee²² indicano, che per l'esame qualitativo con strisce reattive dei costituenti dell'urina, il campione deve essere conservato in frigorifero, senza l'aggiunta di conservanti, ed analizzato entro le 24 ore. Per l'esame degli elementi del sedimento urinario il campione deve essere refrigerato se non viene analizzato entro un'ora dalla raccolta, in alcuni campioni potrà verificarsi la precipitazione di urati e fosfati, in tal caso è necessario richiedere un nuovo campione e analizzato subito a 20°C; inoltre un prolungamento del ritardo nell'analisi causa la lisi degli elementi presenti in urine alcaline e a basso peso specifico; dopo 2 – 4 ore dalla raccolta i leucociti danno conteggi e risultati dubbi; per evitare/limitare il deterioramento delle elementi urinari presenti nel sedimento, causato dal ritardo nei tempi di analisi del campione, si possono utilizzare dei conservanti.

Tradizionalmente viene utilizzato etanolo (50% in volume) che previene parzialmente la lisi di emazie e leucociti; tra i conservanti presenti in commercio il più utilizzato è la soluzione tampone di acido borico presente nelle provette impiegate per i sistemi automatizzati.

Il campionamento temporizzato delle urine è frequentemente associato ad altre valutazioni (terapia, pasti, attività diurna o riposo a letto), la raccolta viene eseguita ad intervalli predeterminati annotati ciascuno su un contenitore diverso a partire dal tempo zero. Generalmente per i pazienti ospedalizzati non autosufficienti, la raccolta viene eseguita dal personale di assistenza con garanzia di corretta sequenzialità; mentre per i pazienti autosufficienti ma poco collaboranti si possono avere scambi di contenitori con alterata successione di campionamento che causano una non corretta interpretazione dei risultati ottenuti.

Anche le urine delle 24 ore sono difficili da ottenere e bisogna far assegnamento sulla collaborazione della

persona. Il problema maggiore è il campionamento incompleto e in alcuni casi quello di una campionatura eccessiva. Inoltre il campionamento delle urine in età pediatrica può essere soggetto ad inquinamento fecale. La raccolta delle 24 ore è più agevole se effettuata dai pazienti ricoverati con la supervisione dello staff infermieristico, anche per la possibilità di poter avere comodamente a disposizione il contenitore idoneo per il campionamento e conservato adeguatamente lontano da sorgenti di luce e calore.

Rilevante è la corretta informazione (scritta e orale) della persona che dovrà effettuare la raccolta.

Anche se i risultati appaiono clinicamente validi, può permanere il dubbio sulla corretta raccolta. Non esiste altro mezzo di valutazione, se non quello basato sui precedenti del paziente o il volume della diuresi.

Il risultato riferito ad un campione *random* se qualitativo, viene espresso in negativo o positivo (presenza o assenza) di un particolare costituente (ad esempio: glucosio), se il test è quantitativo viene espresso per unità di volume così come per il campione temporizzato e la raccolta 24 ore.

Per l'esame batteriologico è auspicabile una raccolta pulita (previa detersione perineale con acqua) del mitto intermedio in un contenitore sterile, ermeticamente chiuso ed etichettato correttamente.

La corretta informazione e preparazione del paziente sulla raccolta delle urine comporta la riduzione di falsi positivi nelle culture, poiché con la raccolta del mitto intermedio si minimizza la contaminazione con flora commensale uretrale in entrambi i sessi.

L'informazione e la procedura per un campionamento da o con catetere deve essere ben definita, poiché è necessario raccogliere l'urina dal catetere e non dalla sacca per evitare contaminazioni.

La raccolta sterile dell'urina, segnalata opportunamente sulla richiesta dell'esame, può essere assicurata da una puntura sovrapubica; con questa modalità il rischio di colonizzazione di microrganismi in vescica è molto basso rispetto al rischio che si incorre a causa delle manovre che si effettuano con il catetere.

Nei neonati e bambini piccoli la raccolta delle urine viene effettuata in dispositivi dotati di sacchetto, con un'elevata possibilità di contaminazione da microrganismi presenti sulla cute. Tali dispositivi possono essere lasciati in sede per un tempo massimo di una ora, tempi superiori aumentano la probabilità di contaminazione del campione. Specifiche informazioni, presenti nella richiesta, aiutano il laboratorio nella valutazione dei risultati ottenuti dalle colture.

Il campione d'urina per esame microbiologico deve essere consegnato per l'esame entro 2 ore dalla raccolta, per tempi superiori è necessario conservare il campione in frigorifero e non trattarlo con conservanti; nel caso in cui non possano essere rispettate le indicazioni prescritte, si può trattare l'urina con acido borico per stabilizzare leucociti e batteri, e mantenerlo a 20°C per 24 ore. La concentrazione di acido borico può essere

critica per una buona conservazione del campione senza indurre inibizione batterica, perciò è necessario rispettare i limiti di riempimento del contenitore per ottenere una concentrazione ottimale di borato.

Negli anni recenti l'industria ha prodotto dispositivi e contenitori per la raccolta delle urine che contribuiscono alla corretta manipolazione e sicurezza del campione.

Esperienze di monitoraggio della fase extra-analitica

In ogni settore e/o area del laboratorio vi sono differenti processi di preparazione dei campioni da sottoporre ad analisi e di effettuazione delle analisi stesse, che richiedono un'alta qualità del materiale biologico e della gestione della fase preanalitica, per produrre risultati accurati che siano corrispondenti alle condizioni cliniche del paziente.

Villani e Coll.²⁴ in una valutazione continua e sistematica della tipologia e frequenza degli errori della fase extra-analitica, durata un anno a cui hanno partecipato 5 laboratori di strutture ospedaliere italiane certificate, hanno rilevato le seguenti percentuali di errore globale: 660 ppm per l'area di Chimica Clinica, 160 ppm per Ematologia e Coagulazione, 1000 ppm per Immunometria, 30 ppm per l'area di Biologia Molecolare, 5911 ppm per Microbiologia e 5033 ppm rilevazioni in validazione finale di non conformità presenti nella fase preanalitica. Le tipologie prevalenti di errore rilevate per i campioni provenienti dall'ospedale e dalle sedi territoriali senza il diretto controllo del laboratorio sono state: provette o contenitori non idonei (per microbiologia 2500 ppm, coagulazione ed ematologia 175 ppm), prelievi scorretti (volume insufficiente, additivo non idoneo, campione emolizzato o contaminato), campioni coagulati, errori nella compilazione delle richieste degli esami, incompleta identificazione del paziente, trasporto dei campioni non corretto, insufficiente informazione relativa a campioni temporizzati e di notizie cliniche, rari campioni smarriti o scambi di pazienti (Tabella IV). Le cause sono state ricondotte principalmente alla scarsa conoscenza del personale infermieristico di reparto e territoriale sulle modalità di prelievo e all'inefficace utilizzo delle procedure predisposte dal laboratorio per la gestione della fase preanalitica che hanno comportato la non accettabilità dei campioni e a disattenzioni per situazioni critiche dovute a carichi di lavoro eccessivi presenti nei reparti. Inoltre, per i pazienti esterni, il contributo agli errori di compilazione delle richieste è stato causato dal non adeguato aggiornamento del personale amministrativo sul menu dei test.

Con questo studio, il gruppo dei tecnici di laboratorio ha consentito una identificazione chiara delle criticità della fase preanalitica e ha permesso di fare un'attenta analisi delle cause e di impostare le opportune azioni correttive di miglioramento in collaborazione con le figure professionali presenti nei reparti e sul ter-

Tabella IV. Il tecnico sanitario di laboratorio nella gestione del dato analitico (modificata)²⁴.

<i>Descrizione Non Conformità fase preanalitica</i>	<i>ppm</i>
Campione non identificato	150
Richieste non idonee	280
Prelievo scorretto	610
Errato rapporto anticoagulante/sangue	240
Campione emolizzato	600
Campione coagulato	950
Campione insufficiente	590
Campione lipemico	870
Prelievi ripetuti	80

ritorio e con il personale amministrativo del laboratorio, condividendo procedure di rilevazione e di prevenzione degli errori.

La stesura di procedure definite per la validazione dei risultati permette un'ulteriore valutazione a posteriori dell'accettabilità del campione.

Un efficace ed efficiente controllo del processo di validazione richiede la descrizione, delle azioni categorizzate, in protocolli operativi che consentono a tutti i professionisti coinvolti la standardizzazione di comportamenti corretti e il monitoraggio dell'intero percorso del campione acquisendo metodi atti ad evitare che i dati di laboratorio inaccurati e imprecisi portino all'innescarsi di un meccanismo diagnostico errato con gravi conseguenze diagnostiche e terapeutiche sul paziente.

In uno studio²⁰ condotto nel Laboratorio di Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Pordenone, si è valutata per un periodo di 5 mesi la performance di applicazione dei protocolli operativi per la validazione tecnica e biologica dei risultati emocromocitometrici da parte del gruppo di tecnici di laboratorio del settore Urgenze. I protocolli operativi prevedono una serie di controlli di validità sui risultati e sul campione attraverso azioni suddivise schematicamente in verifiche di primo e secondo livello.

Alle verifiche di primo livello, appartengono gli indicatori di qualità extra-analitica che prevedono la valutazione della corretta identificazione del paziente, la scelta del tipo di provetta o del contenitore, il tipo di prelievo e il trasporto in laboratorio, l'adeguatezza e la preparazione del campione per l'analisi.

Alle verifiche di secondo livello appartengono gli indicatori di qualità analitici ed extra-analitici con le valutazioni sui risultati, dal controllo della fase analitica a quella postanalitica e comunicazione dei dati critici al clinico.

La verifica del dato ottenuto, si realizza attraverso i metodi del controllo di qualità, della performance analitica, delle interferenze conosciute e del controllo degli errori formali, la verifica del dato in rapporto alla variabilità intra e interindividuale e delle interferenze biologiche, la valutazione trasversale verso gli intervalli di riferimento, la valutazione di congruità e plausibilità con

Tabella V. Protocolli operativi per la validazione dell'esame emocromocitometrico urgente.

<i>Livelli</i>	<i>Azioni</i>
Verifiche di 1° livello	Verifica dei fattori preanalitici
Verifiche di 2° livello: Valutazioni sui risultati e in casi specifici comunicazione dei dati al medico di laboratorio/clinico	<ul style="list-style-type: none"> - Verifica dei fattori postanalitici generici - Verifica dei fattori postanalitici per PLT (piastrinopenie/crioglobulinemie) - Verifica dei fattori postanalitici per valori critici/panici (WBC, RBC, Hb, HCT, PLT) - Comunicazione dei dati panici

Tabella VI. Protocolli operativi: verifiche di secondo livello.

<i>Livelli</i>	<i>Azioni</i>
Verifica dei fattori postanalitici generici	<ul style="list-style-type: none"> - presenza di microcoaguli - ripetere l'emocromo a 37°C - diluire il campione
Verifica dei fattori postanalitici per valori critici/panici (WBC, RBC, Hb, HCT, PLT)	<ul style="list-style-type: none"> - presenza di microcoaguli - controllo risultati precedenti - telefonare in reparto per verificare se il <i>dato critico/panico</i> sia correlabile/compatibile con le condizioni cliniche del paziente o con precedenti emocromi: <ul style="list-style-type: none"> - dato atteso/previsto → convalidare i risultati - dato non compatibile con sintomi del paziente o dato inaspettato: richiedere l'invio di un nuovo campione di conferma
Verifica dei fattori postanalitici per PLT (piastrinopenie/crioglobulinemie)	<ul style="list-style-type: none"> - controllare la presenza di allarme strumentale per aggregati piastrinici - controllare il citogramma del canale Perox e verificare la presenza di aggregati piastrinici (area noise) - controllare le segnalazioni nei risultati precedenti per: <ul style="list-style-type: none"> - aggregati piastrinici - aggregati piastrinici EDTA- indotti - risultati precedenti per crioglobuline e ripetizione dopo termostatazione a 37°C - non convalidare il dato delle PLT: a seguire revisione microscopica
Notifica dei valori critici/panici	<ul style="list-style-type: none"> - avvisare il medico di laboratorio comunicando i dati critici/panici dell'emocromo
Notifica dei valori panici in Urgenza	<ul style="list-style-type: none"> - contattare il clinico, il medico di laboratorio reperibile comunicando i dati panici dell'emocromo - chiamare il medico reperibile per la verifica microscopica dello striscio periferico

gli altri dati del paziente.

I controlli di validità dei risultati e le azioni di verifica secondo i protocolli operativi predisposti e condivisi tra medici e tecnici di laboratorio e adottati nello studio, sono descritti nelle Tabella V e VI.

Nello studio sono stati valutati 5359 esami emocromocitometrici urgenti, processati su ADVIA120™ Bayer, in un periodo di 5 mesi.

Sulla base dei protocolli sono stati selezionati 365 campioni (6,8% del totale) con un impegno di validazione per le verifiche di primo livello, relativamente ai diversi parametri del 3,4% per piastrine, 1,3% per leucociti, 1,3% per emoglobina, 0,7% per emocromo, e un tempo medio complessivo di 10 secondi per ogni campione.

Le verifiche di secondo livello hanno implicato ulteriori valutazioni dei valori critici per il 95% degli emo-

cromi selezionati e rispettivamente per: piastrine pari al 10,3%, leucociti 11,1% ed emoglobina pari al 26,5%. Nel 14,3% dei casi è stato richiesto un altro campione per riconferma, nel 2,4% la revisione microscopica dello striscio periferico; inoltre è stato riscontrato il 2,4% di emocromi diluiti, il 3,6% di campioni non idonei e 1,2% di scambio di pazienti. Sono stati notificati i dati critici (definiti dal laboratorio) al reparto/clinico nel 24,1% dei casi. Le verifiche di secondo livello hanno richiesto un tempo medio di 20 minuti.

Il livello di applicazione dei protocolli operativi da parte dei tecnici sanitari di laboratorio biomedico del settore Urgenze è stato del 98,2% (applicati 29,5% su 30,1% selezionati da protocolli). Il loro impiego ha permesso di prevenire errori preanalitici gravi, monitorare i livelli di non accettabilità del campione, responsabilizzare gli operatori del reparto e del laboratorio

sulle conseguenze degli errori e contribuito al miglioramento del servizio erogato al paziente.

Sistemi di controllo per l'accettabilità del campione

L'automazione della gestione dei campioni nella fase preanalitica con sistemi denominati "stazione preanalitica" permette un maggior controllo dell'errore preanalitico.

La "stazione preanalitica" consente la centralizzazione della raccolta dei campioni, in modo continuo per ampie fasce orarie e il controllo in tempo reale della congruità tra richiesta fatta dal richiedente (reparto/interni, segreteria/esterni) e il campione pervenuto in laboratorio. Permette la creazione delle liste di lavoro da inviare tramite un sistema diretto di comunicazione bidirezionale al computer strumentale e al computer concentratore, la completa rintracciabilità dei campioni transitati in preanalitica e la gestione dei campioni rifiutati per non idoneità. Inoltre, fornisce una preparazione specifica del campione per ogni linea analitica, attraverso la centrifugazione a temperatura controllata e a tempi standardizzati e/o consente l'aliquotazione del campione primario e l'assegnazione automatica dell'identificazione delle provette figlie, mediante etichette con codice a barre, riducendo il numero di provette di sangue per ogni paziente con risparmio di materiale prelevato. Le stazioni preanalitiche sono in grado di operare una diminuzione significativa degli errori nella fase di distribuzione dei campioni ai settori di analisi o verso altri laboratori (Modulo Prenalitico *off-line*) oppure distribuiti direttamente ai sistemi analitici (Modulo Prenalitico *on-line*), con l'obiettivo di migliorare la sicurezza del percorso e della qualità dei campioni, diminuire il rischio biologico nella loro manipolazione, raggiungere un risparmio organizzativo e contribuire all'aumento dell'efficienza del laboratorio²⁵ (Tabella VII).

Il processo di validazione dei risultati prodotti dal laboratorio deve tenere presente i numerosi aspetti della fase preanalitica che contribuiscono al controllo dell'adeguatezza del campione e che consentono nella fase postanalitica il collegamento all'utilizzo clinico dei risultati ottenuti.

La validazione costituisce un multi-indicatore di qualità per la gestione e prevenzione degli errori che influenzano l'accettabilità del campione.

Conclusioni

E' da tempo noto che la qualità del campione è condizione necessaria, anche se non sufficiente da sola, per un risultato analitico di qualità. Tuttavia solo recentemente il problema è stato affrontato in modo radicale, anche se le soluzioni proposte sono ancora non del tutto chiare e condivise.

La valutazione della accettabilità del campione ha un suo fondamentale momento nella fase preanalitica, al-

Tabella VII. Da Holmann e Coll. (modificata)²⁵.

Classificazione errori/eventi	Numero di errori/eventi per mese	
	Pre-FE500	Post-FE500
Errori di selezione e percorso	7950	477
Errori di distribuzione	2612	96
Errori di etichettatura	6668	33
Esposizione a rischio biologico	2658	6

l'entrata del campione nella realtà del laboratorio. Tuttavia il controllo della sua qualità non si esaurisce a questo livello ma continua durante la fase analitica e soprattutto nella fase postanalitica della validazione tecnica *sample oriented* e *patient oriented*.

La produzione di un campione di qualità può essere garantita solo dalla adesione del personale di reparto o del territorio alle linee guida, raccomandazioni o protocolli definiti per la raccolta, trattamento e conservazione dei campioni biologici a fini diagnostici. Il coinvolgimento di queste figure professionali passa attraverso una continua biunivoca comunicazione, il chiarimento delle ragioni fisiopatologiche ed analitiche che rendono necessaria l'integrità del campione e un *audit* sull'applicazione delle regole.

I professionisti della Medicina di Laboratorio sia per le riconosciute competenze analitiche e gestionali che per le loro specifiche conoscenze biologiche e cliniche, sono sempre più coinvolti all'esterno del laboratorio in una efficace attività coordinata e collaborativa di informazione e formazione proattiva rivolta al controllo degli errori extra-analitici e di attiva relazione con il mondo clinico per un'efficace e sicuro utilizzo dei risultati prodotti dal laboratorio

Bibliografia

1. Bruce AJ, Calam RR, Howanitz PJ. Chemistry specimen acceptability. Arch Pathol Lab Med 1997; 121:19-26.
2. CLSI. GP26-A3 Application of a Quality Management System Model for Laboratory Services, Approved Guideline – Third Edition, 5 The Clinical Laboratory's Path of Workflow, NCCLS 2004.
3. Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, Ottomano C, Pansini N, Bonini P. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. Clin Chem Lab Med 2006; 44:150-60.
4. Schiffman RB, Howanitz PJ, Zarbo RJ. Q-Probes: a College of American Pathologists benchmarking program for quality management in pathology and laboratory medicine. In: Weinstein RS, ed. Advances in pathology and laboratory medicine. Chicago: Mosby-Year book; 1996. p. 83-120.
5. Zarbo RJ, Jones BA, Fiedberg RC, Valenstein PN, Renner SW, Schiffman RB, et al. Q-Tracks. Arch Pathol Lab Med 2002; 126:1036-44.
6. CLSI EP7-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition, NCCLS 2005.
7. Plebani M. Towards quality specifications in extra-analytical phases of laboratory activity. Clin Chem Lab Med 2004; 42:576-7.

8. Ricós C, García-Victoria M, de la Fuente M. Quality indicators and specifications for the extra-analytical phases in clinical laboratory management. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:578-82.
9. Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, Ottomano C, Pansini N, Bonini P. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 150-60.
10. Howanitz PJ. Errors in laboratory medicine: practical lessons to improve patient safety. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129:1252-61.
11. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:311-6.
12. Lippi G, Salvagno GL, Brocco G, Guidi GC. Preanalytical variability in laboratory testing: influence of the blood drawing technique. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:319-25.
13. Vermeer HJ, Thomassen E, de Jonge N. Automated processing of serum indices for interference detection by the Laboratory Information System. *Clin Chem* 2005; 51: 244-7.
14. Dimeski G, Clague AE, Hickman PE. Correction and reporting of potassium results in haemolysed samples. *Ann Clin Biochem* 2005; 42:119-23.
15. Brady J, O'Leary N. Interference due to lipaemia in routine photometric analysis-survey of an underrated problem. *Ann Clin Biochem* 1994; 31:281-8.
16. Stahl M, Brandslund I. Controlled storage conditions prolong stability of biochemical components in whole blood. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:210-5.
17. Jones BA, Meier F, Howanitz PJ. Complete Blood Count Specimen Acceptability. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:203-8.
18. Morandini M, Falcomer F, Retto N, Pascutto P, Laghi L, Grizzo F, et al. Protocolli operativi per il referto ematologico in urgenza. *Riv Med Lab-JLM* 2004; 5:172.
19. Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:429-52.
20. Morandini M. La validazione tecnica. *RIMeL/IJLaM* 2005; 1(suppl):48-52.
21. Dale JC, Ruby S. Specimen collection volumes for laboratory tests. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:162-8.
22. ECLM. European Urinalysis Guidelines. *Scan J Clin Lab Invest* 2000; 60(suppl):1-96.
23. Kerr S, Marshall C, Sinclair D. Emergency physicians versus laboratory technicians: are the urinalysis and microscopy result comparable? A pilot study. *The Journal of Emergency Medicine* 1999; 17:399-404.
24. Villani A, Michelotti M, Carrara N, Como F, Lazzarini S, Ribero S. Il tecnico sanitario di laboratorio nella gestione del dato analitico. *RIMeL/IJLaM* 2005; 1(suppl):185.
25. Holman WJ, Mifflin TE, Felder RA, Demers LM. Evaluation of an automated preanalytical robotic workstation at two Academic Health Centers. *Clin Chem* 2002; 48: 540-8.