

01

LAVORO IN LABORATORIO

Il laboratorio clinico è un servizio degli ospedali veterinari, ma sempre più ambulatori ne hanno uno proprio. L'obiettivo principale di quest'area — e del personale che vi lavora — è trattare i campioni biologici nel modo più appropriato per evitare che la loro composizione reale (quella che avevano all'interno del corpo dell'animale) si modifichi prima di raggiungere un analizzatore.

Questi laboratori sono noti come POCT (Point-Of-Care Testing), sono definiti come sistemi analitici che si trovano in prossimità del luogo in cui il paziente riceve le cure e forniscono una serie di risultati di base in un breve periodo di tempo. I principali vantaggi dei POCT sono la facilità d'uso grazie a un design intuitivo, la rapidità dei risultati e la piena disponibilità, in quanto possono funzionare 24 ore su 24 senza interruzioni. Inoltre, alcune marche di analizzatori incorporano misure per evitare errori da parte di personale non specializzato, per esempio correggendo leggermente risultati irrealistici dovuti all'analisi di campioni lipemici.

Inoltre, i Tecnici Veterinari (TV) possono svolgere un gran numero di compiti pratici senza la diretta supervisione del veterinario. Per questo è importante ricevere una formazione specifica e avere una certa esperienza, pena la mancata garanzia di qualità degli studi e degli esami analitici.

PROCESSO ANALITICO

Prima di iniziare il lavoro in laboratorio, è necessario familiarizzare con i seguenti concetti:

- Campione primario: un campione ottenuto da un paziente allo scopo di studiarne lo stato di salute (per es. il sangue).
- Campione secondario: il campione primario che è stato trattato per garantirne la stabilità (per es. sangue anticoagulato con eparina) (Fig. 1.1).
- Campione di lavoro: è la frazione del campione secondario utilizzata per le determinazioni analitiche (per es. plasma eparinizzato).



Figura 1.1

Riempimento di una provetta di eparina con sangue venoso. Il campione scivola lungo la parete della provetta, senza che la siringa tocchi all'interno.

FASE PREANALITICA

È la prima fase del processo analitico. Va dalla richiesta di analisi al trattamento del campione.

Oltre l'80% degli errori si verifica in questa fase. La maggior parte è associata a personale non qualificato, preparazione inadeguata del paziente, informazioni insufficienti, approvvigionamento errato o conservazione e trasporto inadeguati.

Modulo di richiesta

Il personale veterinario compila il modulo con i dati del paziente e gli esami richiesti. Alcuni degli errori più comuni a cui prestare attenzione sono:

- Modulo compilato "su indicazione di". Un modulo compilato viene consegnato al laboratorio da un'altra persona e non dal medico richiedente.
- Mancanza di sospetto clinico. Se si aggiunge il sospetto clinico o il motivo della visita, si eviteranno le ripetizioni dei parametri, si farà una valutazione adeguata dei dati analitici e si potrà persino dare priorità alla consegna di determinati risultati.
- Grafia non chiara o espressione scorretta. Ciò crea confusione nel selezionare i parametri desiderati.

- Dati mancanti del paziente. Se la cartella clinica è stata compilata correttamente, si potrà lavorare in modo efficiente ed evitare il lungo lavoro di ricerca dei dati mancanti. Un altro possibile errore è la duplicazione di cartelle cliniche in laboratorio o l’assegnazione dei risultati di un paziente a un altro con un nome simile.
- Tipo di campione non identificato. In caso di invio al laboratorio di campioni facilmente confondibili (per es. urina e liquidi organici), il tipo di campione deve essere identificabile tramite annotazione in un punto visibile.

È importante annotare nella dispensa o nel quaderno di laboratorio eventuali incidenti osservati al momento del ricevimento del campione, come per esempio:

- Nessun campione: i test vengono richiesti, ma i campioni non arrivano.
- Campione inadeguato: raccolto male, non adatto all’analisi richiesta, contenitore sbagliato, ecc.
- Campione insufficiente: non sufficiente a garantire la qualità dell’analisi. Se è possibile effettuare alcune determinazioni, queste devono essere specificate.
- Campione avanzato: vengono ricevuti campioni non necessari per l’analisi.

Criteri di rifiuto dei campioni

In generale, tutti i campioni che presentano una qualsiasi delle caratteristiche elencate nella Tabella 1.1 devono essere scartati.

Per gli esami del sangue, i pazienti dovrebbero arrivare al centro veterinario con un periodo di digiuno di 6-8 ore, poiché praticamente tutti i parametri sono alterati nel periodo postprandiale (Fig. 1.2).

Tabella 1.1 Motivi del rifiuto dei campioni.

Caratteristica	Motivo
Impossibile identificare il campione	Se non si conosce l’origine del campione, ottenere risultati è inutile.
Volume insufficiente	Se la quantità non è sufficiente, la qualità e l’affidabilità dell’analisi si riducono drasticamente o la procedura non può essere eseguita.
Imballaggio inadeguato	Qualsiasi campione non conservato correttamente altera il risultato.
Trasporto inadeguato	Come sopra, se il campione non è conservato correttamente, il risultato sarà alterato.
Campione emolizzato o lipoemico	I parametri verranno alterati, invalidando il risultato. Il prelievo deve essere ripetuto.

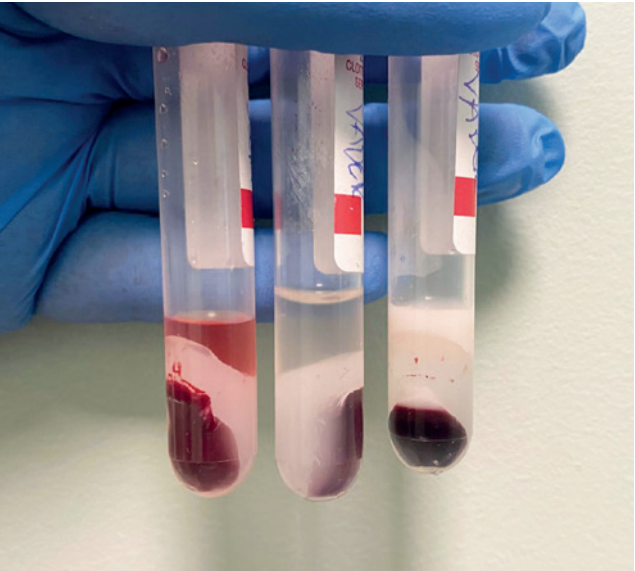


Figura 1.2 Tre sieri dello stesso paziente, *da sinistra a destra*: siero emolizzato da scarsa estrazione, siero di buona qualità e siero lipemico da non digiuno.

Indice HIL

L'indice HIL (emolisi-ittero-lipemia) è un sistema che cerca di ottenere informazioni sulle interferenze e sulla loro influenza sui risultati degli esami biochimici del sangue.

Esistono indici HIL standardizzati nei grandi laboratori e si possono trovare anche indici HIL specifici per ogni analizzatore automatico. Idealmente, dovrebbe essere disponibile un indice HIL accreditato dal produttore dell'analizzatore biochimico; tuttavia, questo non è attualmente disponibile nelle apparecchiature veterinarie. Pertanto, gli indici HIL semiquantitativi adattati possono essere utilizzati nelle cliniche veterinarie per fornire una guida su cui basarsi in caso di risultati anomali (Tab. 1.2).

Tabella 1.2 Alterazioni dell'indice HIL che interferiscono con la misurazione dei parametri biochimici.

Parametro	Emolisi	Ittero	Lipemia	Altre interferenze dei parametri
Alanina aminotransferasi (ALT)	↑	-	-	-
Albumina, secondo il metodo	↑	↑	↑	-
Bilirubina totale, secondo il metodo	↑	-	↑	-

Parametro	Emolisi	Ittero	Lipemia	Altre interferenze dei parametri
Calcio	-	↑	↑	Plasma EDTA: ipocalcemia artefatta Periodo postprandiale: ipercalcemia artefatta
Cloro	-	-	↓	Pazienti con iperproteinemia o campioni non chiusi: ipocloremia dovuta a disseccamento
Colesterolo	↑	-	-	-
Creatina chinasi (CK), secondo il metodo	↑	-	↑	-
Creatinina, secondo il metodo	↑	↓	↓	Presenza di vitamina C, acido urico, somministrazione di cefalosporine e piruvato: aumenta la creatinina
Fosfatasi alcalina (ALP)	↑	-	-	Analisi del plasma in EDTA
Fosforo, secondo il metodo	↑	↑	-	-
Gamma-glutamilttransferasi (GGT), secondo il metodo	↓	-	-	-
Glucosio	-	-	-	Non centrifugare e separare il campione nei 30-60 minuti dopo l'estrazione: ipoglicemia artefatta
Azoto ureico/urea, secondo il metodo	↑	-	↓	-
Potassio	↑	-	↓	Prelevare il campione da un'estremità in cui è presente una linea con la fluidoterapia a base di potassio
Proteine totali, secondo il metodo	↑	↑	↑	-
Sodio	↓	-	↓	Pazienti con iperproteinemia e iperglicemia: pseudoiponatremia

Si propone il seguente indice HIL adattato (Fig. 1.3):

- Emolisi: valutazione della colorazione, da leggermente rosa a rossa.
- Ictero: valutazione della colorazione, leggermente gialla o arancione.
- Lipemia: valutazione della torbidità, da leggermente torbida a opaca.

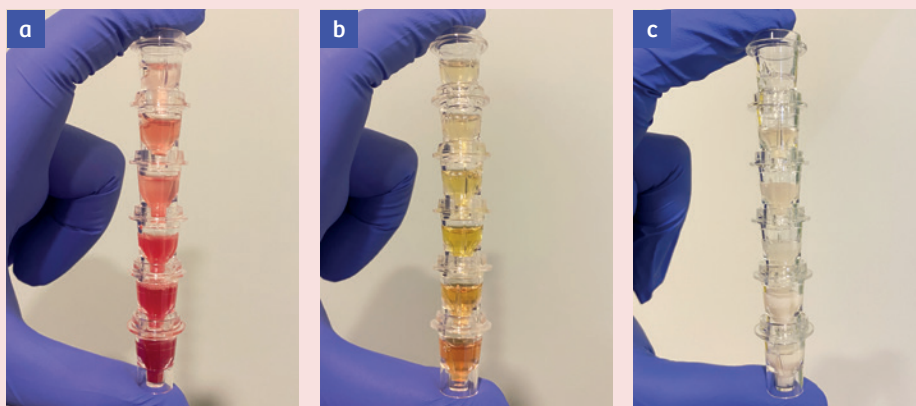


Figura 1.3 Gradienti di emolisi (a), ictero (b) e lipemia (c).

L'emolisi è la rottura dei globuli rossi, con conseguente colorazione rosata/rossastra del plasma o del siero. Possono verificarsi due tipi di emolisi: l'emolisi *in vivo*, cioè l'emolisi che si verifica all'interno del paziente a causa di alterazioni patologiche (per es. anemia emolitica) e che è impossibile prevenire al momento del prelievo del campione, e l'emolisi *in vitro*, che è artefatta a causa di una cattiva elaborazione del campione. Alcune cause dell'emolisi *in vitro* sono: tecnica di prelievo inadeguata (per es. spostamento dell'ago troppo in profondità nella vena, punture multiple dello stesso vaso, pressione eccessiva quando si ritrae lo stantuffo), mancata rimozione dell'alcol dalla pelle prima della puntura, agitazione eccessiva della provetta, centrifugazione del sangue prima che si sia coagulato per ottenere il siero o conservazione prolungata.

L'ittero è la colorazione gialla assunta dalla frazione liquida del sangue dovuta a un'aumentata concentrazione di bilirubina. La bilirubina proviene dagli eritrociti degradati e, quando si accumula in grandi quantità, dà origine a questo colore giallo. È spesso associata a malattie del fegato, ma anche a neoplasie o malattie infettive. Delle tre alterazioni dell'indice HIL, l'ittero, come l'emolisi *in vivo*, non può essere evitato perché dipende interamente dal paziente e non è influenzato dalla lavorazione del campione o da cause esogene.

La lipemia (in senso stretto, iperlipidemia) è forse il più comune dei tre disturbi e si manifesta come un'alterazione della densità del plasma o del siero, che diventa di colore biancastro. Di solito è dovuta a un prelievo di sangue postprandiale, sebbene siano state descritte anche alcune malattie ereditarie canine (per es. negli Schnauzer nani, nei Rottweiler e nei Pastori delle Shetland) con anomalie lipidiche.

Si raccomanda un digiuno di almeno 8 ore per eliminare il principale fattore di interferenza che causa la lipemia; tuttavia, ci sono pazienti che, anche con un lungo digiuno, rimangono con una lipemia associata a malattie come la pancreatite, le malattie epatiche, le nefropatie da perdita di proteine o la somministrazione di farmaci (per es. i glucocorticoidi). È importante notare che la lipemia provoca una maggiore fragilità delle cellule del sangue, con conseguente emolisi *in vitro*.

Poiché si tratta di un disturbo molto comune, esistono tecniche come l'ultracentrifugazione o l'aggiunta di reagenti che possono ovviare a questo problema. Anche se gli ambulatori veterinari di solito non dispongono di un'ultracentrifuga, è possibile ottenere un effetto simile con i seguenti suggerimenti:

- Prelevare una quantità di sangue superiore a quella necessaria per creare uno spazio tra lo strato lipidico (situato nella zona superiore) e il fascio cellulare (zona inferiore).
- Conservare in frigorifero per diverse ore (per es. per tutta la notte).
- Centrifugare a velocità più elevate del solito.

Tutti i campioni emolitici o lipemici devono essere scartati; tuttavia, una lieve emolisi (rosata, ma mai rossa o arancione) o una lieve lipemia (leggermente torbida) non alterano significativamente i risultati.



I campioni lipemici ed emolitici non devono essere analizzati. Nel caso di campioni emolitici, si raccomanda di ottenere un nuovo campione, prestando attenzione ai momenti più delicati. Nel caso di campioni lipemici, un nuovo prelievo deve essere riprogrammato dopo un digiuno di 8 ore.

Errori più frequenti

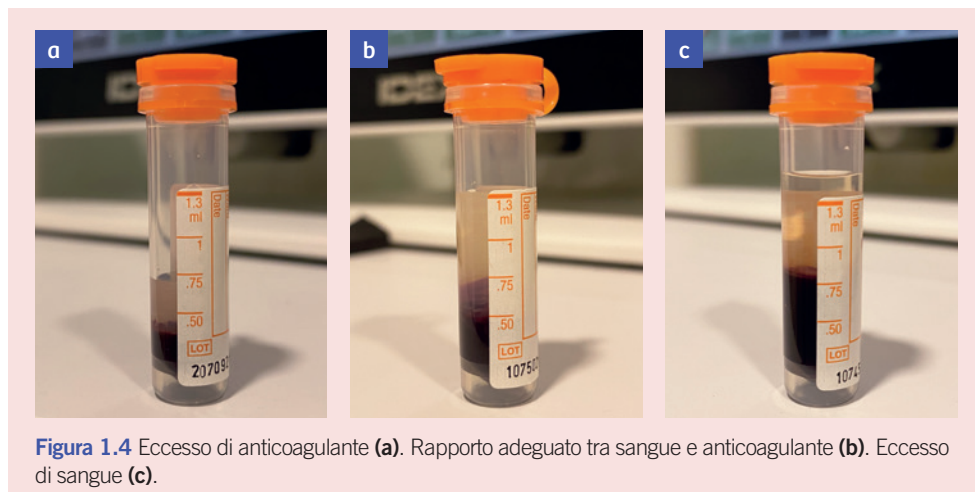
Di seguito, i criteri di scarto specifici sono elencati per tipo di campione. Conoscendo i “punti oscuri” in cui si commettono più spesso errori, è possibile prestare maggiore attenzione per evitarli.

Analisi ematologica

- Riempimento incompleto o non corretto della provetta.
- Prelevare il sangue dalla stessa estremità in cui si trova la linea con la fluidoterapia.
- Prelevare il campione con una siringa per emogasanalisi contenente eparina.
- Ritardare l'omogeneizzazione con l'anticoagulante, che può provocare una coagulazione totale o parziale del campione.
- Toccare l'interno del contenitore con la siringa.

Analisi biochimica

- Riempire la provetta senza anticoagulante con sangue proveniente da altre provette con additivi anticoagulanti o toccare l'interno del flacone con la siringa.
- Prelevare il sangue dalla stessa estremità in cui si trova la linea con la fluidoterapia.
- Spingere troppo forte lo stantuffo della siringa o agitare la provetta, provocando emolisi.
- Mancato lavaggio corretto delle provette di anticoagulanti (Fig. 1.4).



Quando il lavaggio è inadeguato, possono verificarsi due situazioni. Se c'è più sangue che anticoagulante, il campione si coagula e non può essere utilizzato. Se, invece, è stato raccolto un campione troppo scarso, oltre al fatto che potrebbe essere necessario un campione maggiore per lo studio, si verificheranno alterazioni come coagulazione o lisi cellulare o cambiamenti significativi nei risultati.

Gas ematico

- Non specificare l'origine del campione: arterioso, capillare o venoso.
- Non rimuovere completamente tutte le bolle d'aria.
- Ritardare l'analisi del campione o non conservarlo al freddo.
- Mancata omogeneizzazione adeguata del campione.

Analisi delle urine

- Ritardare l'analisi per più di 6 ore.
- Conservare il campione al freddo prima dell'analisi.
- Non temperare il campione refrigerato se si vuole effettuare una determinazione.
- Contaminazione fecale del campione.

Analisi delle feci

- Non utilizzare contenitori adatti.
- Riempire il contenitore fino all'orlo.
- Mancata chiusura corretta del contenitore.

Analisi di liquidi organici

- Non prelevare un campione di sangue periferico per confrontare i valori.
- Refrigerare il campione.
- Mancata separazione del campione in contenitori appropriati per lo studio.
- Nel caso del liquido cerebrospinale, ritardare l'analisi del campione per più di mezz'ora o metterlo in frigorifero.

FASE ANALITICA

La fase successiva è quella dell'analisi vera e propria, cioè dall'esecuzione della tecnica alla convalida dei risultati sull'apparecchiatura.

Circa il 6% di tutti gli errori di laboratorio si verificano durante la fase analitica e sono legati a reagenti difettosi, errori nelle diluizioni o alla mancanza di controlli e calibrazioni.

FASE POST-ANALITICA

L'ultima fase è quella post-analitica, che si concentra principalmente sulla comunicazione dei risultati.

Per quanto riguarda gli errori, in questa fase se ne registrano circa l'8% e sono dovuti a problemi di comunicazione all'interno del team e a errori nel calcolo e nella trascrizione dei risultati.

FLUSSO DI LAVORO

Lavorare in modo protocollato ed efficiente è la base del lavoro di laboratorio, sia per ottenere risultati rapidi e accurati sia per evitare contaminazioni incrociate.

Triage in laboratorio

Il triage è un sistema che classifica i pazienti in base alla loro gravità. È uno strumento comunemente utilizzato nelle cure d'emergenza, ma l'autore raccomanda di seguire questa classificazione di triage anche in laboratorio per ottimizzare il lavoro.

L'autore ha stabilito i seguenti livelli, che possono essere adattati in base alle esigenze dell'ospedale o dell'ambulatorio.

1. **Livello rosso:** emergenza. Pazienti in condizioni critiche. Tutte le altre attività vengono interrotte e questi campioni hanno la priorità (per es. determinare il glucosio e il potassio).
2. **Livello arancione:** pazienti instabili. Pazienti ricoverati ma per i quali è necessario conoscere rapidamente un valore per valutare la loro situazione (per es. per sapere se è necessario prescrivere un farmaco).
3. **Livello giallo:** consultazioni. Pazienti che vengono per un controllo o nell'ambito di un piano sanitario (per es. la determinazione della creatinina in pazienti con malattie renali croniche).
4. **Livello verde:** pazienti stabili. Pazienti ricoverati che rimangono stabili e nei quali i parametri vengono analizzati quotidianamente (per es. la determinazione degli ioni durante la fluidoterapia).
5. **Livello blu:** campioni da inviare a laboratori esterni. Se un campione deve essere inviato a un laboratorio esterno, deve essere preparato dopo l'esecuzione di tutte le altre analisi.

REGOLE DI BASE

I laboratori diagnostici veterinari, come quelli presenti nei centri veterinari, sono classificati come laboratori di livello di biosicurezza 2 (NBS 2). I laboratori NBS 2 sono quelli che trattano fluidi organici con agenti patogeni a rischio moderato associati a malattie umane che, sebbene contagiose, non sono pericolose per la vita.

Per questo motivo, le norme igieniche di base devono essere seguite e rispettate come misure preventive:

- Non mangiare, bere o fumare in laboratorio.
- Indossare sempre abiti da lavoro (camice o uniforme).
- Lavarsi regolarmente le mani.
- Il laboratorio deve essere situato in un locale adibito esclusivamente a questo scopo, lontano dalle aree di passaggio e ricreative.
- Indossare guanti ogni volta che si maneggia un campione biologico o un reagente chimico.

- Non lavorare senza protezioni (medicazioni) in caso di ferite alle mani o alle braccia.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- Il materiale biologico non deve mai lasciare il laboratorio.
- La preparazione e la manipolazione dei campioni devono essere eseguite nel più breve tempo possibile, ma con calma per ridurre al minimo la possibilità di aerosol.
- Gli effluenti degli analizzatori sono considerati infettivi e devono essere smaltiti direttamente nello scarico.
- Non toccare il viso o altre parti del corpo con le mani sporche.
- Per il corretto funzionamento dell'apparecchiatura devono essere presenti un'adeguata ventilazione, una buona illuminazione e una temperatura adeguata.
- L'ordine è essenziale per ridurre la contaminazione incrociata e i rischi potenziali e per garantire la qualità dell'analisi.
- Pulire l'area di lavoro prima e dopo la giornata lavorativa e ogni volta che si sporca.
- Smaltimento corretto del materiale.

PROTOCOLLI DI LAVORO STANDARD

Il personale che lavora in laboratorio deve seguire le procedure operative standard (POS) per garantire un lavoro metodico ed efficiente. Le POS sono documenti elaborati dal responsabile del laboratorio che descrivono le procedure standard. Devono essere comprensibili per tutti i lavoratori della struttura e compatibili con gli strumenti disponibili (Fig. 1.5).

I documenti coprono tutto, dalle istruzioni su come prelevare ed elaborare i campioni e le tecniche analitiche, evidenziando i “punti oscuri” in cui si commettono più errori, alle istruzioni sulla manutenzione delle apparecchiature.



Figura 1.5 I protocolli devono essere collocati in aree facilmente accessibili e raggiungibili da tutti i membri del team.

Il principale vantaggio dell'utilizzo delle POS è la riduzione degli errori, grazie alla possibilità di seguire sempre gli stessi passaggi. Inoltre, se un lavoratore lascia il suo posto per cause di forza maggiore, un altro lavoratore può continuare il suo lavoro senza problemi. Altri vantaggi delle POS sono che garantiscono la registrazione dei dati, migliorano l'organizzazione e l'esecuzione delle attività e facilitano il lavoro e il monitoraggio.

Anche le SDS dei reagenti chimici sono incluse nelle POS (si veda sotto).

MAGAZZINO E STOCCAGGIO

Il magazzino è l'insieme dei prodotti immagazzinati in attesa di essere utilizzati. Il controllo delle scorte fa parte delle funzioni quotidiane di un Tecnico Veterinario, con l'obiettivo principale di garantire che non vi sia mai una carenza di materiale e quindi evitare interruzioni involontarie del lavoro.

La diversità dei prodotti (Fig. 1.6) varia molto da un centro veterinario all'altro, poiché dipende direttamente dal numero di pazienti, dalle attrezzature utilizzate e dai test offerti. Per questo motivo, il personale responsabile dell'area dovrebbe stilare un elenco dei materiali necessari, tenendo conto del modello di lavoro, del budget disponibile, del numero dei pazienti, delle tecniche utilizzate e delle attrezzature che compongono il laboratorio.



Figura 1.6 Il controllo delle scorte deve essere effettuato settimanalmente. Non utilizzare mai un reagente scaduto, di aspetto dubbio o che si sospetta sia danneggiato.

Oltre a questi fattori, è necessario conoscere i seguenti concetti:

- **Scorta minima:** è la quantità minima necessaria per poter lavorare.
- **Scorta massima:** è la quantità massima che può essere immagazzinata. Dipende dallo spazio disponibile e dalle date di scadenza.
- **Momento dell'ordine:** è il momento in cui si decide di effettuare un ordine.
- **Scorte straordinarie:** si tratta di materiali che vengono ordinati in eccesso rispetto alla scorta massima, in ragione di una domanda elevata, di un vantaggio economico o di un evento imprevisto. Per esempio, se il volume di lavoro aumenta e questa settimana, invece di usare tre scatole di un prodotto, ne sono state usate sei, il momento dell'ordine verrà anticipato e ne verranno ordinate altre nel caso in cui la domanda continui.

Il magazzino del laboratorio deve essere ordinato, non deve avere temperature elevate per garantire la stabilità dei materiali e deve essere organizzato secondo la tecnica FIFO (*first in, first out*). Questa tecnica significa che il primo ad entrare è il primo ad uscire, cioè i prodotti da utilizzare per primi sono quelli che sono stati acquistati per primi.

Materiali e attrezzature necessari per un laboratorio

Come già detto, i materiali necessari dipendono dall'ambulatorio veterinario o dall'ospedale. I materiali e le attrezzature sono classificati come segue:

- **Gruppo A:** articoli con un costo elevato, utilizzabili nel tempo e suscettibili di manutenzione costante; chiamati anche articoli inventariabili (per es. apparecchiature analitiche).
- **Gruppo B:** articoli con un costo intermedio e una breve durata di conservazione (materiali di consumo), ma che possono essere riutilizzati (per es. micropipette).
- **Gruppo C:** materiali con un costo basso e un solo utilizzo (per es. provette per campioni).

Gruppo A

Esistono diverse aziende che vendono analizzatori automatici per la medicina veterinaria. Quando si acquista un dispositivo, è consigliabile informarsi non solo sul costo, ma anche sulle condizioni ambientali richieste, sullo spazio necessario e sulla manutenzione da effettuare.

In generale, per essere considerato ottimamente attrezzato, un laboratorio dovrebbe disporre delle seguenti apparecchiature:

- **Analizzatore ematologico.** Si tratta di un'apparecchiatura deputata alla conta delle cellule, di solito ematiche. Può essere utilizzata anche per altri liquidi, come i versamenti pleurici o le asciti. La manutenzione è semplice; di solito è sufficiente un risciacquo e una pulizia mensile dell'esterno e dei filtri.
- **Analizzatore biochimico.** In medicina veterinaria, la maggior parte di queste apparecchiature utilizza la tecnologia della biochimica a secco, vale a dire usa piastre reagenti, e la manutenzione è minima, limitata alla pulizia mensile e ai controlli semestrali o annuali. Esistono apparecchiature che utilizzano altre tecniche, come la biochimica umida, ma sono meno comuni e richiedono una cura molto maggiore per quanto riguarda i controlli, le calibrazioni e altri tipi di manutenzione rispetto alle apparecchiature per la biochimica a secco (Fig. 1.7).
- **Analizzatore di coagulazione.** Si tratta di apparecchiature molto sensibili e, sebbene di solito non richiedano manutenzione, è utile conoscerne alcuni dettagli:
 - Non è consigliabile tenerli in luoghi eccessivamente caldi o esposti alla luce diretta per lunghi periodi di tempo.
 - Questi dispositivi eseguono autocontrolli prima e durante l'analisi.
 - Vengono eseguiti controlli di qualità automatici.
- **Analizzatore di analisi delle urine.** Esistono diversi dispositivi sul mercato, soprattutto quelli per l'interpretazione delle strisce di urina, anche se gli analizzatori di sedimenti di urina stanno diventando sempre più comuni. La loro manutenzione si riduce alla pulizia e alla calibrazione settimanale.
- **Analizzatore di gas nel sangue.** Gli analizzatori di gas si trovano solitamente negli ospedali dotati di pronto soccorso o di un'unità di terapia intensiva (ICU). Di solito sono progettati per richiedere una manutenzione minima. La manutenzione varia a seconda delle marche, ma in genere richiede una calibrazione trimestrale e una pulizia regolare.
- **Analizzatori di test rapidi.** Sono apparecchiature che interpretano i risultati dei test rapidi. Non richiedono una manutenzione ordinaria; tuttavia, se necessario, i componenti interni possono essere puliti.
- **Microscopio ottico.** Si tratta di uno strumento che permette di osservare elementi che non possono essere visti a occhio nudo. Un fascio di luce e una serie di lenti vengono utilizzati per ingrandire le strutture fino a renderle visibili. Alcune considerazioni sui microscopi ottici includono:
 - Spegnerne sempre la luce dopo ogni utilizzo, abbassare il piano di appoggio al massimo e lasciare l'obiettivo con l'ingrandimento più basso, vale a dire quello con le dimensioni più piccole, in modo che non urti il piano di appoggio.
 - Quando non viene utilizzato, il microscopio deve essere coperto con un rivestimento plastico per evitare che sporco e polvere si accumulino sopra.

- Se la polvere si trova in aree difficili da raggiungere, deve essere rimossa con uno scopino di plastica, una spazzola o un accessorio simile. Non soffiare mai via la polvere.
- Deve essere posizionato su un tavolo con una buona stabilità. Se è necessario trasportarlo, il braccio deve essere tenuto con una mano e la base sostenuta con l'altra.
- Non forzare le viti.
- Per utilizzare l'obiettivo 100x è necessario l'olio per immersione (Fig. 1.8).



La manutenzione di un microscopio ottico è semplice ma essenziale per prolungarne la durata e per poter osservare con precisione i campioni.

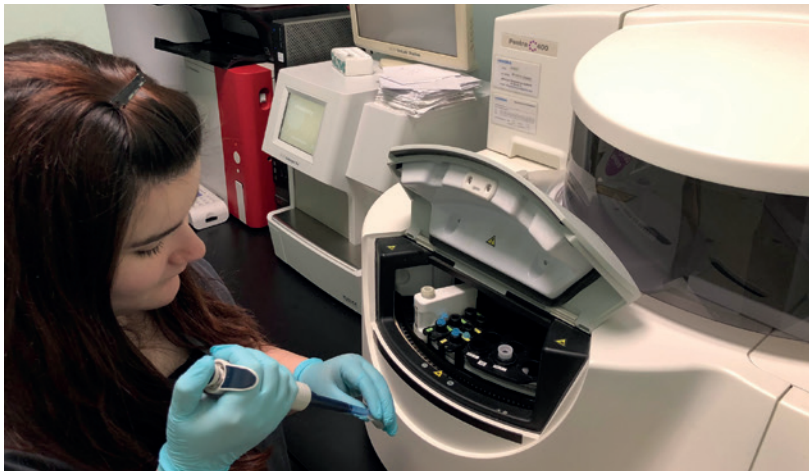


Figura 1.7 Gli analizzatori di biochimica per via umida non sono generalmente apparecchiature per test point-of-care e richiedono un'ampia manutenzione quotidiana.



Figura 1.8 Quando si utilizza l'obiettivo a immersione (100x), è necessario applicare dell'olio sul vetrino coprioggetto.

Come regolare facilmente un microscopio

L'uso corretto del microscopio ottico si basa su una buona manipolazione, che richiede la conoscenza delle sue componenti (Fig. 1.9). La tecnica corretta per l'osservazione e la messa a fuoco è la seguente:

1. Posizionare il vetrino sul piano di appoggio con il campione rivolto verso l'alto. L'obiettivo a più basso ingrandimento deve essere in posizione.
2. Accendere la sorgente luminosa.
3. Ruotare la vite macrometrica fino a quando le strutture del campo sono chiaramente visibili (non è necessario vederle completamente). Non è necessario utilizzare nuovamente la vite macrometrica.
4. Mettere a fuoco con la vite micrometrica ruotandola delicatamente fino a quando il campione è nitido e definito.
5. Passare a un obiettivo con un ingrandimento maggiore. Quando l'immagine è di nuovo sfocata, ruotare la vite micrometrica finché non è chiaramente visibile.
6. Ripetere l'operazione con gli obiettivi successivi.
7. Se si usa l'obiettivo a immersione, mettere una goccia di olio a immersione facendo attenzione a non toccare l'obiettivo 40x. Far scorrere il revolver fino a posizionare l'obiettivo 100x.
8. Ruotare le viti di mobilità, poste sotto il piano di appoggio, per individuare l'area di interesse. Tenete presente che l'immagine è invertita, quindi se girate la vite a destra, l'immagine si sposterà a sinistra e, allo stesso modo, se volete salire, dovete spostare la vite in basso.

Per l'osservazione al microscopio, si consiglia di posizionare un coprioggetto sul preparato per migliorare la visualizzazione. Un numero crescente di dispositivi dispone di obiettivi calibrati in base allo spessore del coprioggetto.

Se si utilizza l'olio per immersione, questo viene posto sul vetrino coprioggetto. È possibile aggiungere l'olio direttamente sul campione, ma in questo caso è bene tenere presente che il campione si macchierà con il reagente e sarà inutilizzabile per osservazioni future.

Gruppo B

Le attrezzature riutilizzabili più frequentemente impiegate sono centrifughe, rifrattometri e pipette automatiche.

- **Centrifuga.** Si tratta di un'apparecchiatura di base che si trova in tutti i laboratori. Viene utilizzata per separare i componenti in base alla loro densità, di solito per separare i solidi dai liquidi. La manutenzione della centrifuga è fondamentale:
 - Posizionarla su un piano stabile senza pericolo di scosse.
 - Non utilizzare mai senza compensazione, vale a dire i tubi da inserire devono essere sempre rivolti l'uno verso l'altro.

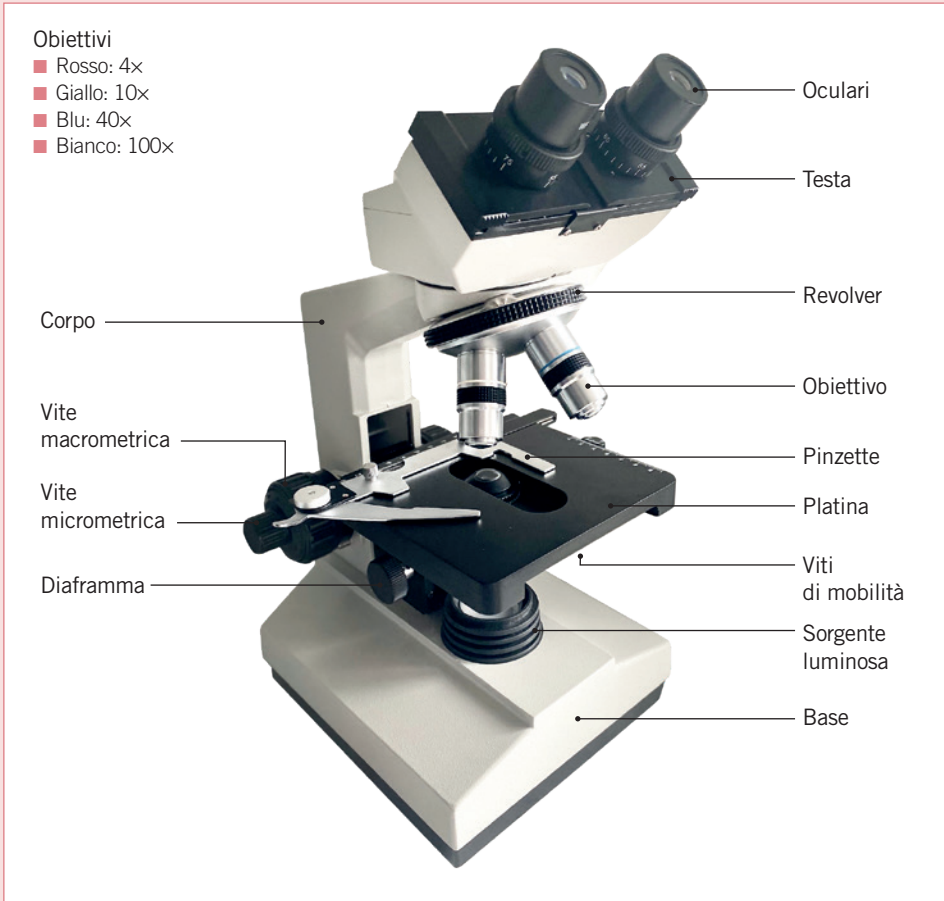


Figura 1.9 Parti del microscopio ottico.

- Non utilizzare provette di vetro in cattive condizioni.
- Non aprire l'apparecchiatura prima che si sia arrestata completamente o che si sia fermata.
- **Rifrattometro manuale o Goldberg** (Fig. 1.10). Si tratta di un semplice strumento che misura la luce rifratta attraverso un campione liquido. Nonostante l'apparente semplicità del rifrattometro, esso richiede una cura particolare rispetto ad altre apparecchiature:
 - Mantenere completamente puliti sia il coperchio che la copertura. Pulire con un panno inumidito con acqua distillata dopo ogni utilizzo.
 - Non graffiare in alcun modo.

- Conservare in un luogo asciutto, al riparo da urti e cadute.
- Calibrare ogni settimana:
 - Il rifrattometro deve essere completamente pulito.
 - Applicare una goccia di acqua distillata sul coperchio.
 - Chiudere il coperchio e osservare; la linea di taglio dovrebbe essere a zero. In caso contrario, ruotare la vite di calibrazione fino a raggiungere tale livello.
 - Asciugare l'acqua distillata e riporlo nella sua scatola protetta fino al prossimo utilizzo.
- **Pipette automatiche.** Si tratta di strumenti di alta precisione per prelevare e trasferire liquidi. La manutenzione è molto complessa, ma con una corretta tecnica di pipettaggio, la cura è ridotta al minimo. Alcune considerazioni sulle pipette automatiche includono:
 - Se gli addetti alla manipolazione delle pipette non hanno sviluppato un certo grado di abilità nella tecnica di pipettaggio, è importante utilizzare puntali con filtro per evitare che il liquido tocchi la parte superiore della pipetta e penetri all'interno, danneggiando in modo permanente il meccanismo.
 - Per regolare il volume:
 - Ruotare delicatamente la manopola in senso orario o antiorario. Un movimento brusco potrebbe danneggiare il meccanismo interno.
 - Prima di iniziare il pipettaggio:
 - Assicurarsi che si senta un "clic" quando si regola il volume.
 - Se si pipetta più volte, assicurarsi che il volume non sia cambiato tra un pipettaggio e l'altro.
 - Le cifre devono essere completamente visibili nella finestra.
 - Il volume non deve mai superare il range della pipetta (10-100 μL o 100-1000 μL).



Figura 1.10
Rifrattometro
Goldberg.

- La punta deve aderire perfettamente per garantire una tenuta ermetica.
- Manipolazione della micropipetta:
 - La pipetta deve essere sempre in posizione verticale. Se il campione non viene raggiunto, rovesciare il contenitore del liquido, ma non la pipetta.
 - Inserire la punta nel liquido solo per un paio di millimetri.
 - Prima di prelevare il campione, se si deve raccogliere solo una piccola quantità, è consigliabile sciacquare il puntale riempiendolo e svuotandolo per circa cinque volte.
 - Quando si ripone la pipetta, lasciarla in posizione verticale. La pipetta è “in piedi” quando il pulsante è in alto e il cono del puntale è in basso.

La tecnica del pipettaggio diretto

1. Selezionare una pipetta adatta al volume da erogare. Per aumentare il volume, ruotare il selettore in senso antiorario; per diminuire il volume, ruotare il selettore in senso orario. Inserire il puntale della pipetta.
2. Premere lo stantuffo fino al primo arresto (Fig. 1.11a).
3. Inserire la punta verticalmente nel liquido.
4. Rilasciare lentamente lo stantuffo nella posizione iniziale per aspirare il liquido (Fig. 1.11b).
5. Rimuovere la punta dalla superficie del liquido.
6. Premere lo stantuffo fino al primo arresto per rilasciare il liquido (Fig. 1.11c) e poi fino al secondo arresto per assicurarsi che non rimanga alcun campione nel puntale (Fig. 1.11d).
7. Rimuovere il puntale dal contenitore toccando i lati del contenitore e lasciare lo stantuffo nella posizione iniziale.

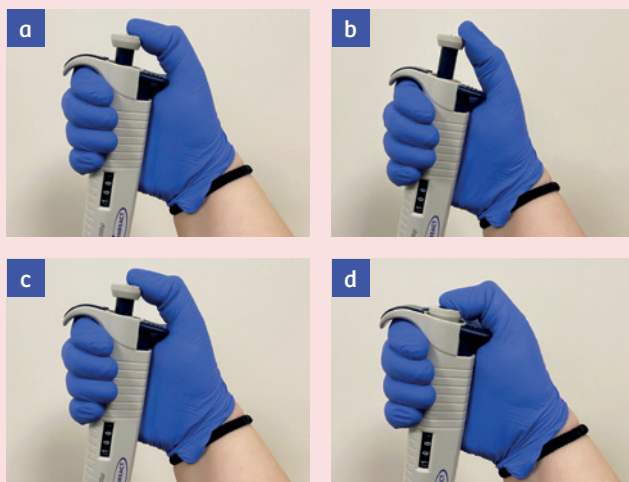


Figura 1.11 Lo stantuffo viene premuto fino al primo arresto (a). Rilasciare lo stantuffo (b). Lo stantuffo viene premuto nuovamente, prima sul primo arresto (c) e poi sul secondo arresto (d).

- Se la pipetta viene lasciata sul tavolo, non deve mai essere lasciata in posizione orizzontale con il puntale attaccato; il puntale deve essere rimosso prima di appoggiarla sul tavolo. Preferibilmente, la pipetta deve essere appoggiata in posizione verticale.



Figura 1.12
Materiali plastici monouso.

Gruppo C

Infine, vi sono i materiali monouso, raggruppati in materiali in vetro (per es. vetrini, capillari, coprioggetti, provette), materiali in plastica (per es. pipette Pasteur, puntali per pipette, cuvette per analisi) (Fig. 1.12) e materiali per la conservazione dei campioni (per es. provette, siringhe, tamponi).

Reagenti chimici

I rischi chimici rappresentano una categoria di rischio propria del laboratorio. Nell'ambito della prevenzione dei rischi, è necessario conoscere ogni reagente chimico con cui si lavora, la relativa scheda di sicurezza e soprattutto i pittogrammi di pericolo (Fig. 1.13):

- Sostanze esplosive: esplosivi instabili, sostanze e miscele a reazione spontanea, perossidi organici.
- Sostanze infiammabili: gas, liquidi o aerosol infiammabili, sostanze e miscele a reazione spontanea, perossidi organici, liquidi o solidi piroforici, sostanze e miscele che subiscono un riscaldamento spontaneo o che a contatto con l'acqua sprigionano gas infiammabili.
- Sostanze ossidanti: liquidi, solidi o gas ossidanti, ovvero quei composti che favoriscono la combustione se combinati con un combustibile. Per esempio, in

un camino, la legna è il combustibile, l'ossigeno è il comburente e la scintilla è l'energia di attivazione.

- Gas sotto pressione: gas pressurizzati, compressi, liquefatti o disciolti.
- Sostanze corrosive: corrosivo per i metalli, gravi danni alla pelle o agli occhi.
- Categoria di tossicità acuta 1, 2 e 3: tossicità orale, cutanea o per inalazione.
- Categoria di tossicità acuta 4: tossicità orale, cutanea o per inalazione, sensibilizzazione e irritazione cutanea, irritazione oculare, tossicità specifica per organi bersaglio, irritazione del tratto respiratorio, effetti narcotici.
- Cancerogeno, mutageno, teratogeno: sensibilizzazione respiratoria, mutagenicità delle cellule germinali, cancerogenicità, tossicità riproduttiva, tossicità specifica per organi bersaglio, rischio di aspirazione.
- Nocivo per l'ambiente acquatico: pericoloso per l'ambiente acquatico.

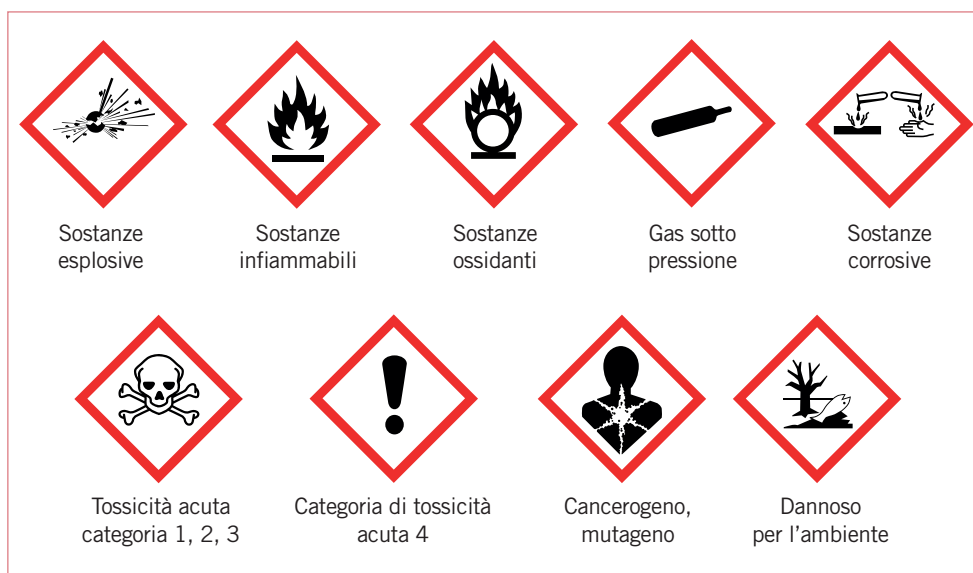


Figura 1.13 Pittogrammi di pericolo. È importante conoscerli per proteggersi adeguatamente quando si utilizzano reagenti chimici.

Tutti i reagenti chimici hanno una scheda di sicurezza o SDS. Le SDS sono lunghi documenti che elencano in dettaglio tutte le informazioni disponibili su una sostanza chimica e forniscono le informazioni necessarie per il suo uso sicuro. Sono lunghe circa venti pagine e comprendono sezioni come l'identificazione dei pericoli, la composizione, le misure di sicurezza antincendio, le misure in caso di rilascio accidentale, la manipolazione e lo stoccaggio, le considerazioni sullo smaltimento e così via.



Le SDS devono essere stampate e conservate in un luogo facilmente accessibile in caso di necessità. Per esempio, in caso di incidente, la sezione 4 della SDS riguarda il primo soccorso.

Per evitare potenziali rischi, se nella struttura veterinaria sono presenti reagenti chimici (per es. metanolo, acido acetico, formaldeide), durante la conservazione è necessario osservare la Tabella 1.3. I reagenti contrassegnati con “sì” possono essere conservati insieme, ma mai quelli contrassegnati con “no” (per es. tossici con esplosivi).

Tabella 1.3 Elenco dei reagenti chimici da conservare.

	Esplosivo	Carburante	Infiammabile	Tossico	Corrosivo	Nocivo
Esplosivo	Sì	No	No	No	No	No
Carburante	No	Sì	No	No	No	Con misure preventive
Infiammabile	No	No	Sì	No	Sì, se i corrosivi non sono in contenitori fragili	Sì
Tossico	No	No	No	Sì	Sì	Sì
Corrosivo	No	No	Sì, se i corrosivi non sono in contenitori fragili	Sì	Sì	Sì
Nocivo	No	Con misure preventive	Sì	Sì	Sì	Sì

GESTIONE DEI RIFIUTI

Chiunque produca rifiuti è obbligato a rispettare le norme di legge per il loro corretto smaltimento. In Italia, si applicano la Legge 152/2006 e il D.P.R. n. 254/2003, insieme alle successive modifiche. Questa normativa ha diversi obiettivi, il principale dei quali è quello di prevenire i rischi per la salute della popolazione, della fauna e dell’ambiente.

Nelle strutture sanitarie si producono i cosiddetti “rifiuti a rischio biologico”, ovvero rifiuti specifici dell’attività clinica che possono contenere residui biologici. Sono suddivisi in sette classi, ciascuna con caratteristiche specifiche:

- Classe I: rifiuti generici: cibo, vetro, cartone, carta, mobili, ecc.
- Classe II: rifiuti bio-sanitari assimilabili ai rifiuti urbani: tutti i rifiuti non compresi nella classe III.
- Classe III: rifiuti speciali a rischio biologico (Fig. 1.14); è ulteriormente suddivisa in nove gruppi:
 - Gruppo 1: rifiuti provenienti da pazienti con infezioni altamente virulente, rare, importate o a bassissima incidenza (per es. rabbia).
 - Gruppo 2: rifiuti contaminati da feci di pazienti affetti da coccidiosi o dissenteria amebica.
 - Gruppo 3: rifiuti contaminati da secrezioni respiratorie di pazienti affetti da tubercolosi o febbre Q.
 - Gruppo 4: filtri per dialisi per pazienti con epatite B, epatite C o HIV.
 - Gruppo 5: rifiuti taglienti.
 - Gruppo 6: colture e stock di agenti infettivi (per es. piastre di Petri, emocolture, estratti liquidi).
 - Gruppo 7: rifiuti di animali infetti.
 - Gruppo 8: contenitori contenenti più di 100 mL di campioni di sangue o derivati ematici in quantità superiore a 100 mL.
 - Gruppo 9: qualsiasi resto anatomico umano riconoscibile come tale.
- Classe IV: cadaveri e resti umani di dimensioni sufficienti.
- Classe V: rifiuti chimici: rifiuti identificati come pericolosi secondo la legislazione vigente, in base alla loro contaminazione chimica.
- Classe VI: residui citotossici.
- Classe VII: rifiuti contaminati da sostanze radioattive.

I rifiuti di classe II, III e VI, che sono i più comuni nelle strutture veterinarie, devono essere smaltiti nei contenitori specifici indicati dalla normativa.



Per rifiuti taglienti si intendono tutti i rifiuti che possono ferire una persona durante la manipolazione, come capillari, provette di vetro, vetrini, coprioggetti, aghi, fiale, ecc.



Figura 1.14 Rifiuti biologici di classe III smaltiti secondo la normativa vigente.

CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI

In generale, i campioni da analizzare presso la struttura veterinaria devono essere conservati secondo le condizioni elencate nella Tabella 1.4 (Fig. 1.15).

Tabella 1.4 Conservazione dei campioni presso le strutture veterinarie.

Campione	Conservazione	Analisi
Sangue intero	EDTA a 4 °C per 4-5 giorni	Emogramma, ELISA, ecc.
Plasma	Separati a 4 °C per 2-3 giorni	Determinazioni biochimiche
Siero	Separati, congelati per 1 mese	Spedizione futura a laboratori esterni
Urina	Conservare in frigorifero per un massimo di 2 giorni	Analisi delle urine (possibili alterazioni), determinazioni biochimiche
Feci	Conservare in frigorifero fino a 7 giorni. Per l'esame coproparassitologico, massimo 3 giorni	Spedizione futura a laboratori esterni
Liquidi organici	Conservare in frigorifero per un massimo di 2 giorni	Determinazioni biochimiche
Campione citologico	Temperatura ambiente, nel portavetrini	Valutazione citologica



Figura 1.15 Esempio di conservazione in ospedale di campioni di sangue, urina e fluidi corporei.

La varietà dei test che possono essere eseguiti internamente sta gradualmente aumentando; tuttavia, per alcuni test, come determinazioni biochimiche speciali, colture batteriche, sierologia, PCR, ecc. i campioni continuano a essere inviati a laboratori specializzati, sia a causa della complessità del test sia per la necessità di materiali e attrezzature specifici. Il campione, il metodo di conservazione e la spedizione sono sempre determinati dal laboratorio scelto. In caso di dubbio, e per evitare di inviare i campioni in modo non corretto, se i risultati sono errati o mancanti, consultare sempre il laboratorio di analisi.



Il tipo di conservazione dipende dal tipo di campione e dall'analisi.

I frigoriferi di laboratorio che conservano i campioni sono mantenuti a una temperatura compresa tra 2 e 6 °C e devono essere dotati di un termometro che indichi la temperatura interna, che deve essere registrata per il monitoraggio in un database almeno una volta al giorno.

I frigoriferi e i congelatori devono essere aperti il meno possibile e alloggiati lontano da fonti di calore per evitare sbalzi di temperatura che potrebbero compromettere o addirittura invalidare la durata di conservazione dei campioni e dei reagenti; si raccomanda pertanto l'uso di frigoriferi e congelatori dedicati.

CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DA INVIARE A UN LABORATORIO ESTERNO

Nei laboratori di analisi esterni si eseguono test complessi che richiedono materiali e attrezzature esclusivi e professionisti altamente qualificati.

Quando i campioni vengono inviati a un laboratorio esterno, si devono sempre seguire le sue linee guida. La Tabella 1.5 mostra, a titolo di esempio, le condizioni di conservazione dei campioni per alcune delle analisi più comuni.

Tabella 1.5 Conservazione generale dei campioni da inviare a un laboratorio esterno*.

Determinazione	Quantità	Campione	Conservazione
Cobalamina	0,3 mL	Siero	Refrigerato
Toxoplasma (IgG + IgM)	0,5 mL	Siero	Refrigerato
Acidi biliari	0,3 mL	Siero	Refrigerato
Renina+aldosterone	1 mL + 1 mL	Siero + plasma EDTA	Congelato
Anticorpi antirabbia	1 mL	Siero	Refrigerato
Anticorpi contro il coronavirus felino	0,2 mL	Siero	Refrigerato
Patogeni PCR nelle feci	5 g	Feci	Il giorno stesso, non refrigerato
Esame citologico	-	Su diapositiva, fisso	Temperatura ambiente
Campione biptico	-	In formalina	Temperatura ambiente
PCR del calicivirus	1 tampone	Issopo senza supporto	Temperatura ambiente
Coltura batterica	1 tampone	Issopo con media	Temperatura ambiente

* Le condizioni devono sempre essere concordate con il laboratorio che esegue l'analisi.

TRASPORTO DI CAMPIONI BIOLOGICI

Il trasporto di campioni biologici è regolamentato da diverse normative a seconda dell'area di residenza. Tuttavia, la più importante a livello globale proviene dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ed è in vigore dal 2009. In primo luogo, i campioni sono classificati in due gruppi principali:

- Sostanze infettive: sostanze contenenti agenti patogeni che possono causare malattie nell'uomo o negli animali. Sono disciplinate dalle norme per il trasporto di merci pericolose.
 - Categoria A: sostanze infettive che causano incapacità permanente o pericolo di vita.
 - Categoria B: sostanze infettive non incluse nella categoria A.

- Sostanze esenti: sostanze che non sono incluse nel gruppo precedente, per esempio campioni contenenti microrganismi che non causano malattie nell'uomo o negli animali, sostanze non infettive, prodotti del sangue, tessuti, ecc.



In caso di dubbio sulla natura infettiva o meno di un campione, si deve sempre applicare il principio più restrittivo e qualsiasi campione biologico deve essere trattato come potenzialmente infettivo.

La categoria A è riservata ai laboratori ad alta sicurezza; quindi, questi agenti patogeni non si trovano in una struttura veterinaria. Regole simili si applicano alle sostanze infettive di categoria B e ad altre sostanze diagnostiche (per es. campioni di pazienti).

Gli imballaggi possono essere riutilizzati, ma devono essere prima disinfettati. Tutti i contrassegni o le etichette della spedizione precedente devono essere rimossi.

Per la spedizione, ai fini della sicurezza (sia per il corriere che per il campione) si raccomanda di seguire la “regola dei tre pacchi” (Fig. 1.16):

- Contenitore primario: provetta che raccoglie il campione opportunamente identificata (per es. provetta EDTA).
- Contenitore secondario: contenitore in cui viene posto il contenitore primario con un materiale assorbente in caso di fuoriuscita. Se è necessaria la refrigerazione, per esempio utilizzando il ghiaccio, questo deve essere collocato nel contenitore secondario, se possibile in un'area impermeabile tra il contenitore secondario e quello terziario e mai a contatto diretto con il campione.
- Imballaggio terziario: contenitore, solitamente una busta, contenente l'imballaggio secondario e la relativa e necessaria documentazione.

Tutti i grandi laboratori hanno un sistema informatico interno basato sull'uso di codici a barre. Pertanto, al momento della preparazione della spedizione, invece di identificare la stessa scrivendo a mano i dati, viene sempre aggiunto un adesivo con il codice in posizione verticale (Fig. 1.17).

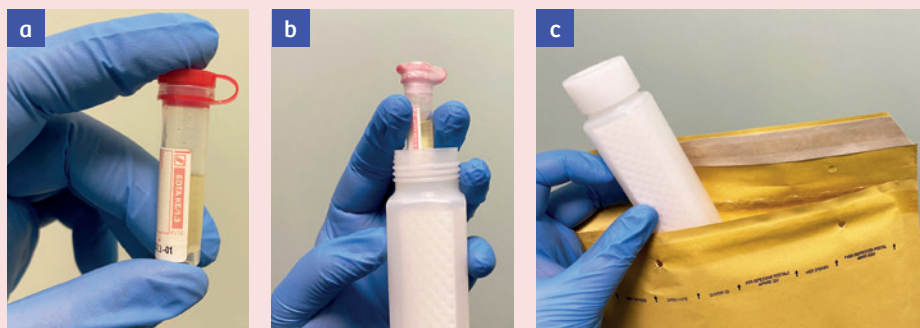


Figura 1.16 Imballaggio primario (a), secondario (b) e terziario (c).

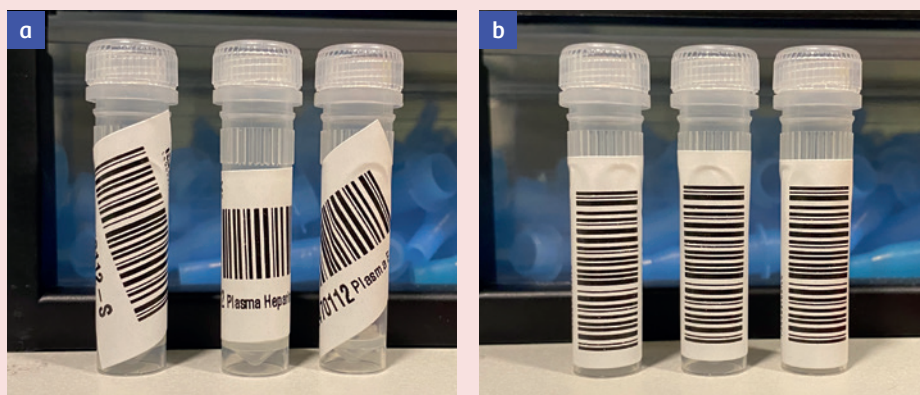


Figura 1.17 Adesivi posizionati in modo errato; il lettore di codici a barre non è in grado di leggerli (a). Adesivi posizionati correttamente (b).