

# Influenza della concentrazione di sodio citrato sulla determinazione del tempo di protrombina, del tempo di tromboplastina parziale attivata, del dosaggio del fibrinogeno e dell'antitrombina

C. Lorenz<sup>1</sup>, M. Bassetti<sup>1</sup>, A. Valentini<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio di Patologia Clinica I, Ospedale S. Chiara, Trento

<sup>2</sup> Servizio di Fisica, Ospedale S. Chiara, Trento

**Premesse:** E' noto che la concentrazione di sodio citrato nelle provette da prelievo per i test della coagulazione influenza i test stessi con una diminuzione di tempi di coagulazione al diminuire della concentrazione da 129 mM a 105 mM. Tale diminuzione è però dipendente dal reagente impiegato e dall'accoppiata reagente/strumento. Abbiamo voluto verificare l'influenza della concentrazione dell'anticoagulante di prelievo su reagenti Dade-Behring impiegati nei laboratori del Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio della Provincia Autonoma di Trento.

**Metodi:** Abbiamo misurato i campioni di 60 soggetti sani e di 110 soggetti in terapia anticoagulante orale stabilizzata, prelevati con la concentrazione attualmente in uso di sodio citrato 129 mM e con la concentrazione 105 mM consigliata dallo NCCLS.

**Risultati:** I tempi dei campioni prelevati con sodio citrato a concentrazione 105 mM sono più corti rispetto ai tempi degli stessi campioni prelevati in so-

dio citrato 129 mM. Tali differenze sono statisticamente significative per il PT, il dosaggio del fibrinogeno e dell'antitrombina. Il ricalcolo della media di pool (MNPT) utilizzando i campioni di soggetti sani non elimina le differenze degli INR ottenuti con le due concentrazioni di anticoagulante, rendendo indispensabile anche una correzione dell'ISI.

**Conclusioni:** Le differenze tra risultati ottenuti con diverse concentrazioni di anticoagulante, pur se significative da un punto di vista statistico per PT, fibrinogeno e antitrombina, non lo sono da un punto di vista "clinico". Mentre per il dosaggio del fibrinogeno e dell'antitrombina, al momento, non c'è modo di eliminare le differenze, per il PT si può ricalcolare la media di pool da usare per ottenere il ratio di PT e si può aumentare l'ISI del 5.7% (usando il Thromborel R della Dade-Behring) per ridurre al minimo le differenze tra INR sugli stessi campioni prelevati in sodio citrato 129 e 105 mM.

## Introduzione

I campioni di sangue per l'esecuzione di test coagulativi vengono raccolti aggiungendo un anticoagulante: il citrato trisodico ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ). Questo ha la funzione di chelare gli ioni  $Ca^{++}$  plasmatici, rendendoli indisponibili per l'attivazione dei fattori della coagulazione e rendendo, di fatto, impossibile la coagulazione stessa. L'esecuzione dei test coagulativi prevede la ricalcificazione del plasma, in quanto vengono aggiunti ioni  $Ca^{++}$ , sotto forma di reattivo starter, nei test coagulativi a due stadi, o direttamente con il primo reagente, nei test ad un solo stadio.

La concentrazione del citrato è una delle variabili che possono influenzare il risultato dei test coagulativi<sup>1,2</sup>, la cui importanza è nota da molti anni<sup>3,4</sup>, so-

prattutto per i campioni di pazienti in terapia anticoagulante orale e/o in terapia eparinica. Attualmente sul mercato sono disponibili tre diverse concentrazioni di citrato trisodico (Na-citrato): 105 o 109 mM (3.2%) e 129 mM (3.8%). Le concentrazioni più basse vengono usate principalmente in alcuni paesi di lingua anglosassone (Inghilterra, Paesi Bassi, Australia), mentre le concentrazioni più elevate di citrato trisodico sono usate principalmente nei paesi latini (Italia, Spagna, Grecia). Tuttavia, in molti altri paesi europei e negli Stati Uniti sono usate, in strutture diverse, entrambe le concentrazioni citate. Sia l'OMS che i comitati di standardizzazione nazionali e internazionali si sono occupati del problema. Già nel 1983 la World Health Organization (WHO)<sup>5</sup> suggeriva di usare una con-

centrazione di citrato trisodico compreso tra 100 e 136 mM. Il problema è stato successivamente affrontato anche dall'NCCLS che ha pubblicato un documento sull'argomento (documento H21-A2) nel 1991<sup>6</sup>, successivamente integrato dal documento H21-A3<sup>7</sup> del 1998, in cui si consiglia di usare una concentrazione di citrato trisodico compresa tra 105 e 109 mM.

I tempi dei test coagulativi di campioni raccolti in citrato trisodico 129 mM sono più lunghi rispetto ai tempi degli stessi campioni raccolti con una concentrazione di anticoagulante 105 o 109 mM<sup>1,2,4,8</sup>, anche se questa differenza non è costante lungo tutto l'arco dei possibili risultati. Inoltre, è segnalato un comportamento variabile alle diverse concentrazioni di anticoagulante da parte di reattivi di diversa estrazione o sintesi e dalle possibili accoppiate reagente-strumento, tanto è vero che Adcock<sup>2</sup> parla di reagenti responsivi e reagenti relativamente non responsivi alla variazione della concentrazione di citrato trisodico. Al momento, non si possono, quindi, fare previsioni sul comportamento del proprio reagente al variare dell'anticoagulante usato.

Abbiamo, pertanto, voluto valutare il comportamento dei reagenti impiegati nel nostro laboratorio (che sono gli stessi usati in tutti i laboratori della nostra provincia), per il PT, l'aPTT, il fibrinogeno e l'antitrombina misurando gli stessi campioni prelevati sia in citrato trisodico 105 mM, che 129mM. Quest'ultima concentrazione è quella che utilizziamo normalmente.

## Materiali e metodi

### *Campioni di sangue*

Nel periodo aprile-maggio 2001 sono stati raccolti presso il Centro Prelievi del Laboratorio di Patologia Clinica 1 dell'Ospedale S. Chiara di Trento 60 campioni da soggetti sani e 110 campioni da soggetti in Terapia Anticoagulante Orale (TAO) stabilizzata. Si è scelta questa numerosità di soggetti sani per avere un campione consistente di valori normali per il calcolo del MNPT e MNaPTT, mentre i soggetti in TAO garantivano un ventaglio di valori patologici per il PT e l'aPTT, ma non, necessariamente, per il dosaggio del Fibrinogeno e dell'Antitrombina. Poiché i valori delle misurazioni di questi ultimi due test sono risultati nell'ambito della norma, non si è potuto procedere alla suddivisione dei campioni in normali e patologici: di conseguenza l'elaborazione dei dati di Fibrinogeno e Antitrombina è stata fatta sull'intero campione. I campioni normali sono stati usati per ottenere la media geometrica di PT e di aPTT per il calcolo del ratio. Il prelievo è stato effettuato con minima stasi usando i dispositivi sottovuoto da 4,5 ml (Vacutainer, Becton and Dickinson, Plymouth, UK), contenenti citrato trisodico rispettivamente 105 e 129 mM. Il rapporto sangue:anticoa-

gulante è risultato di 9:1. Il plasma è stato ottenuto per centrifugazione (2500 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente). Sono stati eseguiti i test PT, aPTT, dosaggio del fibrinogeno secondo il metodo coagulativo di Clauss e dell'antitrombina con metodo cromogenico. I campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente e testati entro 4 ore dal prelievo. Le determinazioni sono state eseguite durante la normale routine giornaliera, testando i campioni dello stesso soggetto, raccolti con le due diverse concentrazioni di anticoagulante, nella stessa serie analitica, uno di seguito all'altro. L'intera seduta di prova ha coperto un intervallo di 18 giorni lavorativi.

### *Reagenti*

Abbiamo usato il Thromborel R (Dade-Behring, Marburg, Germania) lotto n°525519, (ISI = 1,22) per la determinazione del tempo di protrombina, il Pathromtin SL (Dade-Behring) lotto n° 523754 per la determinazione del tempo di tromboplastina parziale attivato, il Multifibren U (Dade-Behring) lotto n° 519865 per il dosaggio del fibrinogeno e il Berichrom Antithrombin/Antitrombina III (Dade-Behring) lotto n° 520148 per il dosaggio dell'antitrombina.

### *Strumento*

Abbiamo utilizzato un coagulometro automatizzato BCS (Dade-Behring), con la versione software di gestione n° 2.2.

### *Calibrazione dei metodi*

L'INR fornito dalla ditta produttrice e l'MNPT sono stati adattati all'accoppiata strumento/reagente mediante l'uso di plasmali liofilizzati a INR noto, derivanti dall'Austrian Society for Quality Assurance and Standardization of Medical Diagnostic Tests. Non è specificata la concentrazione di sodio citrato con cui sono stati raccolti i campioni. Inoltre, l'MNPT è stato controllato con la media geometrica dei valori in secondi di 20 soggetti sani, come raccomandato dal Cismel.

La ratio di aPTT è stata ottenuta per calcolo utilizzando come MNaPTT la media geometrica dei valori in secondi degli stessi 20 soggetti sani utilizzati per il calcolo del MNPT.

La calibrazione del dosaggio del Fibrinogeno secondo Clauss è stata ottenuta mediante l'utilizzo del set di calibratori a 6 diverse concentrazioni di proteina, fornito dalla ditta Dade-Behring e i cui valori sono ottenuti con il metodo di Ratnoff-Menzie e Kjeldahl. Non è specificata la concentrazione di sodio citrato con cui sono stati raccolti i campioni.

Il dosaggio cromogenico dell'antitrombina è stato calibrato usando il Sample Human Plasma della Dade-Behring. Tale pool di plasmali, di cui non è nota la concentrazione di anticoagulante usato per il prelievo, è calibrato contro standard del WHO.

### *Dati e analisi statistiche*

**Tabella I:** Riassunto del test di Kolmogorov Smirnov<sup>1</sup> per PT e aPTT.

<b>Risultato test Kolmogorov-Smirnov per P=0.05</b>	<b>Campioni NON PATOLOGICI (n = 60)</b>	<b>Campioni PATOLOGICI (n = 104)</b>
PT Tempo in sec con 129 mM	N.S.	N.S.
PT INR con 129 mM	N.S.	N.S.
PT Tempo in sec con 105 mM	N.S.	N.S.
PT INR con 105 mM	N.S.	N.S.
aPTT Tempo in sec con 129 mM	N.S.	P<0.05
aPTT Ratio con 129 mM	N.S.	P<0.05
aPTT Tempo in sec con 105 mM	N.S.	P<0.05
aPTT Ratio con 105 mM	N.S.	P<0.05

**Tabella II:** Riassunto del test di Kolmogorov Smirnov<sup>1</sup> per Fibrinogeno e Antitrombina.

Fibrinogeno tempo in sec. 129 mM	N.S.
Fibrinogeno mg/dl 129 mM	N.S.
Fibrinogeno tempo in sec.105 mM	N.S.
Fibrinogeno mg/dl 105 mM	N.S.
Antitrombina % 129 mM	N.S.
Antitrombina % 105 mM	N.S.

**Tabella III:** - PT - Campioni normali (n = 60).

	<b>Na-citrato 129 mM</b>			<b>Na-citrato 105 mM</b>		
	<b>secondi</b>	<b>INR misurato</b>	<b>INR calcolato Media=12,11 s</b>	<b>secondi</b>	<b>INR misurato</b>	<b>INR calcolato Media=11,96 s</b>
Media	12,13	0,94	1,00	11,98	0,92	1,00
D.S.	0,76	0,08	0,08	0,73	0,07	0,08
CV%	6,30	8,13	7,70	6,12	8,11	7,50
Minimo	10,60	0,80	0,85	10,70	0,80	0,87
Massimo	14,40	1,10	1,24	14,30	1,10	1,24

**Tabella IV:** - PT - campioni patologici (n = 104).

	<b>Na-citrato 129 mM</b>			<b>Na-citrato 105 mM</b>		
	<b>secondi</b>	<b>INR misurato</b>	<b>INR calcolato Media=12,11 s</b>	<b>secondi</b>	<b>INR misurato</b>	<b>INR calcolato Media=11,96 s</b>
Media	29,00	2,74	2,93	27,24	2,53	2,75
D.S.	8,04	0,95	1,01	6,95	0,80	0,87
CV%	27,73	34,62	34,60	25,50	31,75	31,74
Minimo	15,00	1,21	1,30	14,80	1,20	1,30
Massimo	59,40	6,52	6,96	52,90	5,66	6,13

**Tabella V:** - aPTT - campioni normali (n = 60).

	<b>Na-citrato 129 mM</b>			<b>Na-citrato 105 mM</b>		
	<b>secondi</b>	<b>Ratio misurato</b>	<b>ratio calcolato Media= 31,53 s</b>	<b>secondi</b>	<b>Ratio misurato</b>	<b>ratio calcolato Media= 31,29 s</b>
Media	31,76	0,94	1,01	31,54	0,95	1,01
D.S.	3,94	0,11	0,12	4,10	0,12	0,13
CV%	12,41	12,07	12,41	13,01	13,01	13,01
Minimo	25,10	0,75	0,80	25,00	0,75	0,80
Massimo	41,10	1,23	1,30	40,80	1,23	1,30

**Tabella VI:** - aPTT – campioni patologici (n = 104).

	Na-citrato 129 mM			Na-citrato 105 mM		
	secondi	Ratio misurato	radio calcolato Media= 31,53 s	secondi	Ratio misurato	ratio calcolato Media= 31,29 s
Media	51,18	1,53	1,62	49,75	1,48	1,59
D.S.	10,19	0,30	0,32	9,95	0,30	0,32
CV%	19,91	19,94	19,91	20,00	20,01	20,00
Minimo	35,50	1,06	1,13	34,00	1,01	1,09
Massimo	100,40	3,00	3,18	95,80	2,86	3,06

**Tabella VII:** Fibrinogeno (n = 156).

	Na-citrato 129 mM		Na-citrato 105 mM	
	secondi	Mg/dl	Secondi	Mg/dl
Media	17,34	347,45	16,17	369,71
D.S.	4,74	82,22	4,51	89,55
CV%	27,32	23,66	27,91	24,22
Massimo	38,40	672	38,10	724
Minimo	8,60	191	8,20	193

**Tabella VIII:** Antitrombina (n = 165).

	Na-citrato 129 mM	Na-citrato 105 mM
	%	%
media	99,20	101,05
D.S.	10,68	10,54
CV%	10,76	10,43
massimo	124,00	124,00
minimo	71,50	72,70

Abbiamo valutato i risultati dei test in secondi e INR o in secondi e ratio, rispettivamente per il PT e l'aPTT, in secondi e in mg/dl per il fibrinogeno e in attività percentuale per l'antitrombina utilizzando il test t di Student e il test di Wilcoxon, a seconda che la distribuzione del campione fosse normale o meno. Inoltre, abbiamo calcolato la media geometrica dei valori normali (MNPT o MNaPTT) ottenuti sui campioni prelevati in citrato trisodico 105 mM e abbiamo ricalcolato i valori in INR e in Ratio (PT e aPTT, rispettivamente) per confrontare i risultati ottenuti dagli stessi campioni raccolti con le due diverse concentrazioni di anticoagulante eseguendo nuovamente i test statistici sopra citati.

Prima di procedere alle valutazioni statistiche ci siamo assicurati che le distribuzioni dei campioni statistici testati fossero di tipo Gaussiano. Per fare ciò abbiamo applicato la statistica di Kolmogorov-Smirnov, i cui risultati sono riportati nella tabella I per PT e aPTT e nella tabella II per fibrinogeno e antitrombina. Si è utilizzato il test t di Student per dati appaiati, nel caso di distribuzioni normali del campione, cioè per il PT (sia campioni normali che patologici), per l'aPTT (solo campioni normali), per il fibrinogeno e per l'antitrombina.

### Risultati

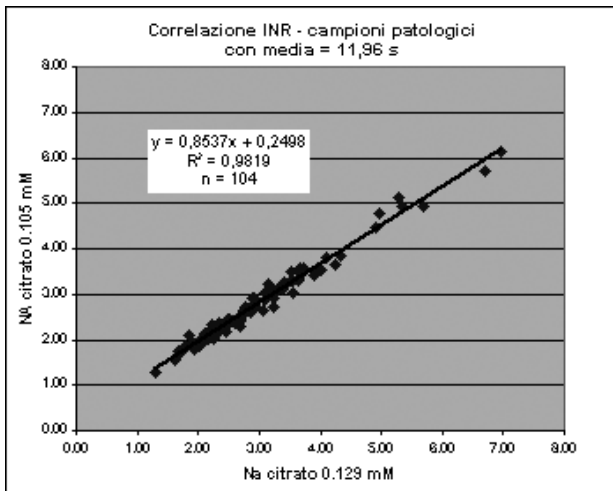
I valori di PT espressi in secondi, ma anche in INR, sono risultati più corti se raccolti in citrato trisodico 105 mM, rispetto ai campioni raccolti in citrato trisodico 129, sia per quanto riguarda i campioni normali (tabella III), che per quelli patologici (tabella IV). Nelle tabelle sono riportati i valori in secondi, i valori di INR misurati con la calibrazione in essere del PT e il ricalcolo dell'INR utilizzando la media geometrica dei campioni normali della prova in atto (rispettivamente 12,11 secondi per la concentrazione 129 mM di citrato trisodico e 11,96 secondi per la concentrazione 105 mM).

Anche i valori di aPTT espressi sia in secondi, che in ratio sono risultati più corti se raccolti in citrato trisodico 105 mM, rispetto ai campioni raccolti in citrato trisodico 129, sia per quanto riguarda i campioni normali (tabella V), che per quelli patologici (tabella VI). Nelle tabelle sono riportati i valori in secondi, i valori di ratio di aPTT misurati con l'MNPTT in essere al momento della prova e il ricalcolo della ratio utilizzando la media geometrica dei campioni normali della prova in atto (rispettivamente 31,53 secondi per la concentrazione 129 mM di citrato trisodico e 31,29 secondi per la concentrazione 105 mM).

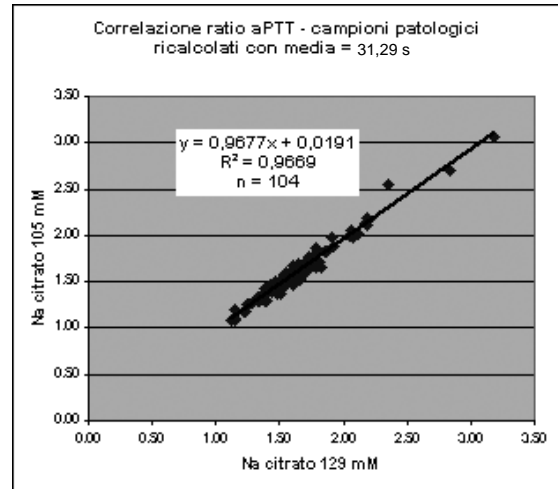
Per il fibrinogeno e l'antitrombina, i cui risultati sono stati elaborati in toto, senza suddivisione in valori normali e patologici, come già esposto, i dati sono evidenziati nella tabella VII, in cui sono riportati i valori in secondi e in mg/dl per il dosaggio del fibrinogeno e nella tabella VIII, in cui sono riportati i valori in attività percentuale di antitrombina, nei campioni raccolti con le due diverse concentrazioni di citrato trisodico.

Come si evince dalla tabella IX, per quanto riguarda

**Figura 1:** correlazione di PT per i campioni patologici tra citrato trisodico 129 mM v.s. 105 mM.



**Figura 2:** correlazione di aPTT per i campioni patologici tra citrato trisodico 129 mM v.s. 105 mM.



**Tabella IX:** Test t di Student fra parametri ottenuti con citrato trisodico 129 e 105 mM.

	Campioni NON PATOLOGICI				Campioni PATOLOGICI			
	Differenza valore medio	n	t	P	Differenza valore medio	n	t	P
PT TEMPI (s)	0,15	60	3.15	0.0025	1,76	104	Infinito	~ 0
PT INR	0,02	60	2.97	0.0043	0.20	104	Infinito	~ 0
aPTT TEMPI (s)	0.22	60	1.44	0.1539	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
aPTT RATIO	0.01	60	1.63	0.1086	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

N.A. = Non Applicato

**Tabella X:** Test di Wilcoxon fra parametri ottenuti con citrato trisodico 129 e 105 mM.

	Campioni NON PATOLOGICI				Campioni PATOLOGICI			
	Differenza valore medio (s)	n	t	P	Differenza valore medio (s)	n	Z	P
PT TEMPI (s)	0,15	60	N.A.	N.A.	1,76	104	N.A.	N.A.
PT INR	0,02	60	N.A.	N.A.	0.20	104	N.A.	N.A.
aPTT TEMPI (s)	0.22	60	N.A.	N.A.	1.43	104	1.403	0.161
aPTT RATIO	0.01	60	N.A.	N.A.	0.04	104	1.393	0.164

N.A. = Non Applicato

il PT, le differenze tra i campioni raccolti con le due diverse concentrazioni di citrato trisodico sono statisticamente significative sia per i tempi in secondi che per gli INR, già per i campioni da soggetti sani e ancora più per i campioni da soggetti in TAO. Per il test aPTT dei soggetti sani, invece, le differenze sia in secondi che in ratio non sono statisticamente significative.

Per l'aPTT dei soggetti patologici le cui distribuzioni risultano significativamente diverse dalle gaussiane ( $P < 0.05$ ) si è utilizzato il test di Wilcoxon per dati appaiati i cui risultati sono evidenziati nella tabella X. Come già accaduto con il test t di Student applicato all'aPTT dei soggetti sani, anche il test di Wilcoxon

applicato agli aPTT dei soggetti patologici indica che le differenze tra i tempi in secondi e i ratio dei soggetti patologici, sui campioni raccolti con le due differenti concentrazioni di citrato trisodico, non sono statisticamente significative.

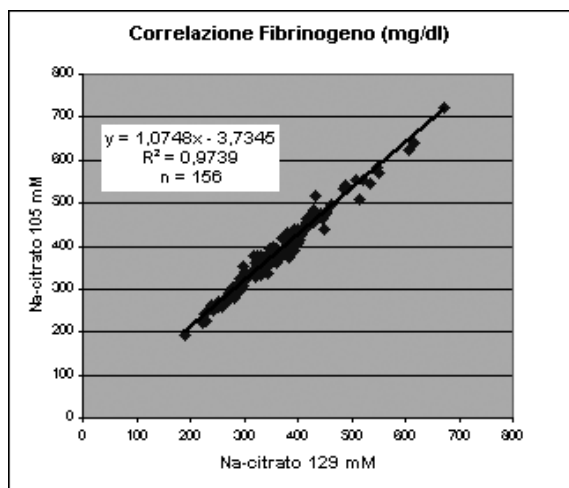
Per cercare di ovviare alla significativa differenza dei valori di PT abbiamo calcolato la media geometrica dei tempi (tempo di pool o MNPT), utilizzando i campioni raccolti nelle due diverse concentrazioni di citrato trisodico da 60 soggetti sani. Abbiamo ricalcolato l'INR per il PT utilizzando tali medie geometriche nelle seguenti relazioni al posto del tempo di pool preimpostato nel coagulometro:

*Tempo\_Paziente*

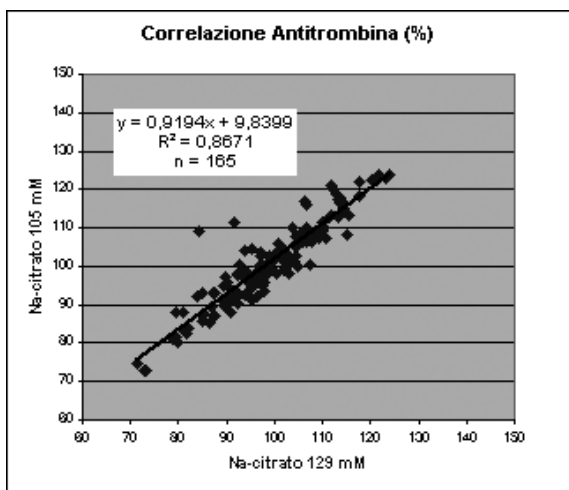
**Tabella XI:** Test t di Student fra parametri ottenuti con citrato trisodico 129 e 105 mM.

Campione NON PATOLOGICI				
	Differenza valore medio (s)	n	t	P
Fibrinogeno (s)	1.16	156	Infinito	~ 0
Fibrinogeno (mg/dl)	-22.26	156	Infinito	~ 0
Antitrombina (%)	-1.84	164	Infinito	~ 0

**Figura 3:** correlazione del dosaggio del Fibrinogeno tra citrato trisodico 129 mM v.s. 105 mM.



**Figura 4:** correlazione del dosaggio dell'Antitrombina tra citrato trisodico 129 mM v.s. 105 mM.



$$Ratio_i = \frac{\text{Tempo}_{105}}{\text{Tempo}_{129}} \quad i = 1 \dots N$$

$$INR_i = Ratio_i^{ISI} \quad i = 1 \dots N$$

dove: N= Numerosità Pazienti

Tempo\_pool= media geometrica dei tempi dei soggetti sani

Anche il test t di Student calcolato sulle serie dei risultati rielaborati con la nuova media di pool ha dato delle differenze statisticamente significative, per

quanto riguarda il PT. Abbiamo evidenziato, perciò, che la semplice correzione con il ricalcolo della media geometrica di pool non è sufficiente ad eliminare le differenze e che è indispensabile intervenire anche sull'ISI, per correggere le differenze introdotte dalla diversa concentrazione di anticoagulante usato per il prelievo. Tale considerazione è supportata anche dal fatto che, aumentando l'INR dei campioni, aumenta anche la differenza dei risultati ottenuti con le due concentrazioni di citrato trisodico. Simili osservazioni sono già state espresse anche da Chantarangkul per il Cismel<sup>1</sup>.

Abbiamo applicato il test t di Student anche al dosaggio del fibrinogeno e dell'antitrombina e, anche per questi due parametri, come per il PT, le differenze tra i campioni raccolti con le due diverse concentrazioni di anticoagulante sono risultate significative. I risultati del test sono evidenziati nella tabella XI.

Abbiamo poi calcolato l'equazione della retta di regressione tra i valori dei campioni raccolti con le due diverse concentrazioni di citrato trisodico e i rispettivi coefficienti di correlazione al quadrato. Come si può notare dalle figure 1 e 2, relativi ai campioni patologici, la correlazione è molto buona con coefficienti di regressione superiori a 0.96, ma per il PT l'intercetta è significativamente diversa da 0 e la pendenza della retta è significativamente diversa da 1.

Anche per il dosaggio del fibrinogeno e dell'antitrombina, come si può notare dalle figure 3 e 4, la correlazione è buona, soprattutto per il fibrinogeno, ma le intercette sono significativamente diverse da 0 e le pendenze della retta sono significativamente diverse da 1.

A questo punto, abbiamo voluto valutare le differenze statistiche da un punto di vista clinico, per vedere se tali differenze avevano conseguenze anche su questo piano. Per il PT abbiamo, pertanto, suddiviso i pazienti in due livelli di anticoagulazione richiesta: un livello basso con INR compreso nel range terapeutico 2,0 – 3,0 e un livello alto con INR compreso nel range terapeutico 3,0 – 4,5. In totale 13 pazienti (12,5%) hanno avuto risultati discordanti con le due concentrazioni di anticoagulante: 6 nel livello basso e 5 nel livello alto di anticoagulazione sono stati considerati sotto il range terapeutico consigliato per la malattia di base con il citrato trisodico 105 mM, un paziente con INR oltre 4,5 con citrato trisodico 129 mM, è risultato in range con la concentrazione più bassa di anticoagulante e, in controtendenza, un paziente considerato sotto il livello minimo di anticoagulazione con il citrato trisodico 129 mM è risultato in range con la concentrazione minore di anticoagulante. Anche dalla valutazione clinica, quindi, si conferma, con l'eccezione dell'ultimo paziente riportato, l'accorciamento dei livelli misurati di anticoagulazione, raccogliendo i campioni con la concentrazione di citrato trisodico 105 mM. Per correttezza, bisogna però rilevare che tutti i pazienti con

risultati discordanti avevano valori di INR borderline, che probabilmente non avrebbero, comunque, indotto il medico a variare la posologia dell'anticoagulante orale ma, eventualmente, avrebbero richiesto un controllo più ravvicinato nel tempo.

Per l'aPTT la stessa valutazione clinica non ha evidenziato differenze tra i campioni raccolti con le due diverse concentrazioni di anticoagulante. Bisogna rilevare, però, che nel nostro campione non erano presenti pazienti in terapia eparinica, ma il campione patologico era rappresentato da pazienti in terapia anticoagulante orale che, avendo una inibizione farmacologica della sintesi di fattore IX, avevano, ovviamente, come effetto collaterale non perseguito terapeuticamente un allungamento dell'aPTT.

Abbiamo eseguito lo stesso confronto per il fibrinogeno e per l'antitrombina. Per il fibrinogeno, 14 campioni (9%) raccolti in citrato trisodico 105 mM sono risultati oltre il range superiore di normalità (tale range nel nostro laboratorio è di 150 – 450 mg/dl) se confrontati con gli stessi campioni raccolti in sodio citrato 129 mM. Per l'antitrombina, tutti i campioni testati con le due diverse concentrazioni di anticoagulante sono risultati nel range di normalità (tale range nel nostro laboratorio è compreso tra il 70 e il 130 %). Bisogna però rilevare che, per queste due determinazioni, i campioni testati non erano patologici per diminuzione della concentrazione di fibrinogeno o per diminuzione di attività di antitrombina, per cui il confronto da un punto di vista "clinico" manca di completezza.

## Discussione e conclusioni

Come già rilevato da altri autori<sup>1,2,8,10,11</sup> i tempi di coagulazione espressi in secondi di campioni raccolti in citrato trisodico 129 mM sono più lunghi rispetto agli stessi campioni raccolti in citrato trisodico 105 mM; ciò avviene sia per il PT che per l'aPTT. Questo fenomeno avviene per tutti i tipi di reagente utilizzati di cui si trova riscontro in letteratura, anche se la variazione è diversa da reattivo a reattivo e da accoppiata reattivo/strumento. Non abbiamo trovato segnalazioni in letteratura (almeno nella ricerca da non eseguita) per quanto riguarda il dosaggio del fibrinogeno e dell'antitrombina.

Il cambiamento della concentrazione di sodio citrato da 129 mM a 105 mM provoca un accorciamento statisticamente significativo dei tempi di coagulazione dei test PT, aPTT e dosaggio del fibrinogeno secondo Clauss, con conseguente diminuzione dell'INR, della ratio di aPTT e aumento della concentrazione della proteina coagulabile, dato che la calibrazione dei test, se è eseguita usando calibratori commerciali invece di pool di plasmidi locali, non è influenzata dalla variazione della concentrazione dell'anticoagulante nella provetta da prelievo del campione. Per il dosaggio dell'antitrombina si ha un

aumento dell'attività dell'anticoagulante naturale al diminuire della concentrazione del sodio citrato nella provetta da prelievo di non chiara comprensione. Poiché il test viene eseguito in presenza di eccesso di trombina aggiunta al mezzo di reazione e che la quota di trombina aggiunta, non inattivata dall'antitrombina del campione, agisce proteoliticamente su un substrato cromogenico, non ci si spiega l'influenza della concentrazione di citrato trisodico nel prelievo. Infatti, la minor concentrazione dell'anticoagulante porta a una maggiore creazione di trombina che dovrebbe dare un dosaggio indicante una minore concentrazione di antitrombina nel campione.

Calcolando la nuova media di pool su campioni normali raccolti in citrato trisodico 105 mM, si assiste a una correzione delle ratio di aPTT quasi totale, per cui le differenze tra i campioni raccolti con le due diverse concentrazioni di anticoagulante che, comunque, non erano statisticamente significative, si annullano interamente. Tale correzione non avviene, invece per il PT, evidenziando, quindi, la necessità di intervenire anche sull'ISI.

Una procedura di correzione simile non si può applicare alla determinazione del fibrinogeno e dell'antitrombina visto che, come già detto, la calibrazione dei test è indipendente dalla concentrazione di anticoagulante del prelievo. Tuttavia, dato l'elevato range di normalità delle due determinazioni, appare clinicamente poco rilevante l'aumento di concentrazione e di attività, rispettivamente, almeno per i campioni a concentrazione di fibrinogeno o attività antitrombinica normale o elevata.

Resta, pertanto, il problema della strategia da adottare per ricalcolare localmente l'ISI, qualora si ritenga comunque significativa la differenza "clinica" a livello di singolo paziente. Tale differenza, nella nostra prova, può essere accettata. Visto che non è praticabile la possibilità di ottenere, in ogni laboratorio e per ogni lotto di reagente, la International Reference Preparation (IRP) contro cui calibrare il proprio reagente, né è possibile al momento ovviare a questo problema utilizzando i plasmidi a INR noti provenienti dalle Verifiche Esterne di Qualità sopranazionali, abbiamo provato a modificare matematicamente l'ISI, per far sì che, anche raccogliendo i campioni dei pazienti in TAO con anticoagulante a concentrazione minore, gli INR forniti al paziente stesso fossero il più possibile non differenti. Questo approccio è stato scelto per non dover modificare la terapia anticoagulante di un paziente il cui INR possa essere al di fuori del range terapeutico, solamente perché è variata una condizione preanalitica, cioè la concentrazione di anticoagulante per il prelievo ematico, ma non la "realtà clinica" di anticoagulato. Per fare questo, abbiamo arbitrariamente assunto come riferimento i risultati dei campioni testati con l'ISI storico e abbiamo individuato l'ISI teorico da applicare al ratio di PT, calcolato con la nuova media di pool, in modo tale da dare la minore differen-

za in media degli INR ottenuti con le due diverse concentrazioni di anticoagulante. Per i campioni della nostra prova, con i reagenti (Thromborel R Dade-Behring) e lo strumento (Behring BCS) da noi impiegati, passando da una concentrazione 129 mM di citrato trisodico a una concentrazione 105 mM, l'aumento di ISI che bisogna applicare perché le differenze in INR siano il più piccole possibile, e quindi per avere la più bassa necessità di variazioni terapeutiche, è del 5.7%.

## Bibliografia

1. Chantarangkul V, Tripodi A, Clerici M, Negri B, Mannucci PM. Assessment of the influence of citrate concentration on the International Normalized Ratio (INR) determined with twelve reagent-instrument combinations. *Thromb Haemost* 1998;80:258-62.
2. Adcock DM, Kressin DC, Marler RA. Effect of 3,2 vs 3,8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997; 107:105-10.
3. Soloway HB, Cox SP, Donahoo JV. Sensitivity of the activated partial thromboplastin time to heparin: effect of anticoagulant used for sample collection. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:760-2.
4. Ingram GI, Hills M. The Prothrombin Time test: effect of varying citrate concentration. *Thromb Haemost* 1976;36:230-6.
5. WHO Expert Committee on Biological Standardisation. Thirty-third Report. Technical Series 687. *WHO, Geneva, 1983.*
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays 2<sup>nd</sup> edition (approved guideline). NCCLS document H21-A2 (ISBN 1-56238-129-6), 1991.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays – Approved guideline. H21-A3. Villanova, PA: NCCLS, 1998.
8. Duncan EM, Casey CR, Duncan BM, Lloyd JV. Effect of concentration of trisodium citrate anticoagulant on the calculation of the International Normalized Ratio and the International Sensitivity Index of thromboplastins. *Thromb Haemost* 1994;72:84-8.
9. Govi G. Variabili preanalitiche nel monitoraggio delle terapie con eparina non frazionata e nel conteggio piastrinico su campioni raccolti in citrato di sodio. *Riv Med Lab* 2000; 1:138-9.
10. Reneke J, Ezzell J, Leslie S, Ng VL, Gottfried EI. Prolonged prothrombin time and activated Thromboplastin time due to filled specimen tubes with 109 mMol/l (3,2%) citrate anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:595-9.
11. Danielson CFM, Davis K, Jones G, Benson J, Arney K, Martin J. Effect of citrate concentration in specimen collection tubes on International Normalized Ratio. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121:956-9.