

Variabili preanalitiche nello studio dell'emostasi

GdS Coagulazione SIMeL

S. Testa, G. Antonucci, G. Martini, S. Pedrini, E. Intra, A. Alatri, R. Bader, F. Manzato

Introduzione

In questi ultimi anni abbiamo osservato un'importante crescita nel numero e nella tipologia degli esami di coagulazione, sia per la diagnosi della patologia emorragica e tromboembolica, sia per la definizione del rischio, sia per il monitoraggio terapeutico dei farmaci anticoagulanti. La ricerca e l'incremento delle richieste hanno favorito il processo di automazione degli esami di laboratorio modificando attività che solo qualche anno fa erano quasi completamente manuali.

La richiesta di un esame presuppone un quesito clinico per il quale l'esame risulta appropriato; il risultato, oltre che essere analiticamente corretto, deve risultare da una adeguata fase preanalitica e da un adeguato sistema di controllo. È quindi opportuno conoscere quali sono le variabili che possono influenzare il risultato inficiando l'interpretazione dell'esame. Gli errori di risultato possono essere causa della non corretta gestione del paziente esponendo lo stesso a gravi rischi.

Le variabili pre-analitiche possono essere definite come " *fattori di variabilità che intervengono sul campione durante la raccolta del sangue, la preparazione, il rimaneggiamento, il trasporto e la conservazione e che hanno la potenzialità di alterarne il risultato*" (E.Dennis. *Advance for Medical Professionals 2002*)

La conoscenza ed il controllo dell'appropriatezza delle richieste, delle variabili biologiche, della fase pre-analitica, della fase analitica, di refertazione e consegna sono tappe indispensabili per un corretto utilizzo delle informazioni fornite da un laboratorio di coagulazione. Le misure del controllo di qualità interno (CDI) e del controllo esterno di qualità (VEQ) non sono sufficienti a garantire l'affidabilità del risultato di laboratorio. Il prelievo di sangue, il trasporto, la conservazione, la preparazione del campione rappresentano fasi critiche sia dei test globali che dei test specifici della coagulazione.

Nonostante la fase preanalitica sia responsabile del 68% circa degli errori totali di laboratorio continua ad essere poco considerata anche se, proprio per la grande rilevanza che assume, è oggetto di studio da

parte di alcuni organismi internazionali quali:

- ECCLS (European Committee for Clinical Laboratory Standards)
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)
- ECAT (European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities of the Commission of The European Communities).

Nel trattare le variabili preanalitiche relative alla coagulazione, si prenderanno in considerazione: il prelievo di sangue, il tipo di provetta e le caratteristiche dell'anticoagulante, il trasporto del campione, la centrifugazione, la conservazione del campione, le variabili associate ad emolisi, ittero e lipemia.

Raccolta dei campioni

Il prelievo di sangue

Il prelievo deve essere effettuato da personale istruito ed esperto, provocando la minima stasi venosa. Attualmente sono disponibili due sistemi di prelievo: il sistema in siringa (sistema aperto) e quello sottovuoto (sistema chiuso). Se si utilizza la siringa, l'ideale per ridurre al minimo l'attivazione della coagulazione è dedicare il prelievo esclusivamente ai test coagulativi, separandoli dagli altri esami ematochimici.

Effettuato il prelievo, è essenziale rimuovere l'ago dalla siringa per evitare l'emolisi, scartare la quantità di sangue necessaria ad eliminare eventuali coaguli presenti nel cono della siringa ed immediatamente dispensare nei contenitori predisposti, senza esercitare eccessiva pressione. Se si utilizzano i sistemi sottovuoto si raccomanda il seguente ordine: per prime le provette senza additivo, quindi quelle con sodio citrato (per la coagulazione) ed a seguire, provette con eparina, EDTA, inibitori della glicolisi. Il prelievo con sistema sottovuoto risulta più standardizzato in tutte le sue fasi. Da una nostra valutazione (dati non pubblicati) effettuata su 100 pazienti in TAO, sottoposti a prelievo in siringa e con sistema chiuso nella stessa seduta, non sono state osservate differenze significative nella determinazione del PT, aPTT, TT, D-Dimero ed F1+2, confermando

l'uso sicuro ed efficace dei sistemi sottovuoto (premissa la corretta valutazione della qualità delle provette utilizzate e del tipo di anticoagulante in uso). Anche se il documento NCCLS del 1998 non registra grosse differenze tra prelievo sottovuoto e prelievo con siringa, bisogna rilevare che negli ultimi anni si è affermata la superiorità del sistema sottovuoto, che comporta un minor contatto del sangue con le superfici e quindi una minore probabilità di attivazione del sistema emostatico. In Italia si stima che circa il 95% dei laboratori ospedalieri italiani utilizza sistemi chiusi. Ulteriori vantaggi dei sistemi sottovuoto sono rappresentati dalla standardizzazione del rapporto sangue/anticoagulante e della forza di aspirazione; l'OMS li raccomanda per garantire la sicurezza degli operatori.

In caso di prelievo da catetere, per evitare contaminazioni con eparina, si raccomanda di scartare i primi 10ml di sangue, utilizzandoli per altri esami di laboratorio. Anche minime quantità di eparina possono allungare l'aPTT rappresentando così una delle cause più frequenti di errore preanalitico nell'esecuzione di questo esame. Quando sia impossibile raccogliere il sangue per altra via, i risultati dovranno essere interpretati con estrema cautela.

Provette

Le provette non devono attivare la coagulazione. Come è noto da più di un secolo, il vetro è un potente attivatore dei fattori di contatto (callicreina, FXII); con conseguente variazione sia dei test globali che dei test specifici. Si raccomanda l'utilizzo di provette con superficie inerte: la plastica (polipropilene) oppure il vetro siliconato offrono al momento i migliori risultati.

Quantità di sangue

Si sconsiglia l'utilizzo di siringhe di grosse dimensioni (volumi >20 ml). In caso di prelievi di notevole entità è opportuno raccogliere il sangue con più siringhe ed utilizzare il materiale della seconda per gli esami di coagulazione.

Tipo di Ago

Per ridurre il tempo di prelievo ed evitare un'eccessiva stasi e' raccomandato l'utilizzo di aghi con un diametro di 19gauge (19G) per prelievi di volume complessivo superiore ai 20ml e 20G per prelievi fino a 20 ml. Solo nei pazienti pediatrici si consiglia l'utilizzo di aghi 21G.

L'uso dei butterfly non è consigliato a causa dell'importante rallentamento del flusso di sangue negli stessi dispositivi, con conseguente attivazione dell'emostasi.

Anticoagulante

L'anticoagulante di scelta è il citrato trisodico (bicitrato). Le concentrazioni disponibili sono 0,109M e 0,129M. Le più recenti osservazioni della lettera-

tura dimostrano come la concentrazione del citrato possa influenzare in maniera significativa il valore dell'INR raccomandando l'utilizzo del citrato 109 mmol/l. Laddove non sia disponibile, possono essere utilizzate senza variazioni significative dell'INR concentrazioni di citrato comprese tra 0,105 e 0,109 M. Un rapporto sangue/anticoagulante scorretto porta a risultati inaccurati dei test coagulativi. Ad esempio un rapporto alterato di 7:1 determina un allungamento del PT e dell'aPTT maggiore di 3,1 secondi. Anticoagulante e sangue devono essere in rapporto fisso 1:9 e devono essere mescolati rapidamente e gentilmente invertendo tre o quattro volte la provetta. L'eccessiva agitazione delle provette può causare emolisi. Poiché l'anticoagulante resta confinato alla fase plasmatica, la sua concentrazione è strettamente dipendente dall'ematocrito. Plasmi ipercitrati determinano tempi più lunghi e viceversa. In pratica si raccomanda la correzione della quantità di anticoagulante (esistono apposite tabelle e formule) per valori di ematocrito inferiori al 30% o superiori al 55%.

Le cause di maggior variazione dei risultati sono però dovute al non corretto riempimento delle provette in sede di prelievo.

Trasporto

Il trasporto delle provette deve avvenire in tempi rapidi. Poiché nell'ambito di una grande routine è difficile avere a disposizione personale addetto ad ogni situazione, si raccomanda l'invio al laboratorio ogni 30-40 minuti del materiale raccolto dalla sala prelievo e nei reparti di degenza.

I campioni non devono rimanere a lungo a temperature superiori a quella ambientale (25°C) e comunque devono essere processati entro 4 ore oppure il plasma deve essere rapidamente congelato; nel caso di dosaggio del FVIII, FV, Fattori della fibrinolisi, Omocisteina si raccomanda di mantenere le provette alla temperatura del ghiaccio fondente (4°C).

Particolare attenzione va posta per il dosaggio dei singoli fattori della cascata coagulatoria, che possono richiedere una conservazione ed un trattamento particolare. In ogni caso bisognerebbe evitare importanti variazioni termiche e bruschi rimaneggiamenti dei campioni. Inoltre si ricorda che alcuni fattori, come ad esempio il FVIII ed il FV sono estremamente labili, pertanto il loro dosaggio implica un'attenta organizzazione della fase preanalitica nel suo insieme.

Centrifugazione

Per ottenere un plasma povero di piastrine la centrifugazione, va effettuata a 2000 x g per 15 minuti. Durante la centrifugazione le provette devono rima-

nere chiuse per evitare variazioni di pH dipendenti dalla perdita di CO₂, che possono modificare l'attività dei fattori in analisi. Per i dosaggi che richiedono un plasma privo di piastrine, come ad esempio la ricerca dell'anticoagulante lupico (LAC), si raccomanda una centrifugazione a 2000-3000 x g per 15-30 min o meglio una doppia centrifugazione con filtrazione del plasma con filtri del diametro di 0,22µm per eliminare completamente le membrane piastriniche.

Sia prima che dopo la fase di centrifugazione si raccomanda l'attento controllo visivo dei campioni da parte di personale esperto, per escludere i campioni coagulati ed identificare i plasmi emolisati, lipemici ed itterici che possono risultare non idonei all'analisi, anche se informazioni disponibili in letteratura sono estremamente limitate.

Tabella I. Temperatura e tempo massimo di conservazione per alcuni parametri coagulativi

Parametro	Metodo	Temperatura °C	Conservazione (tempo)
Fattore VIII Fattore V Fattori della Fibrinolisi	Funzionale	- 30°C - 80°C	2 settimane 6 mesi
	Immunologico	- 30°C - 80°C	6 mesi 1 anno
FII, FII, FX	Funzionale	- 30°C - 80°C	3 mesi 1 anno
	Immunologico	- 30°C - 80°C	6 mesi 2 anni
Antitrombina, PC, PS	Funzionale	- 30°C - 80°C	3 mesi 1 anno
	Immunologico	- 30°C - 80°C	6 mesi 2 anni
Fattore v Willebrand	Funzionale	- 30°C - 80°C	2 settimane 6 mesi
	Immunologico	- 30°C - 80°C	6 mesi 1 anno

Conservazione del campione

Il tempo utile tra il prelievo e l'esecuzione del test è dipendente dalla temperatura e dalle modalità di conservazione, dalle condizioni di trasporto e dal tipo di esame (tabella I).

Congelamento

Si raccomanda il congelamento rapido in azoto liquido o miscela di ghiaccio secco/metanolo o ghiaccio secco/acetone. Mediamente la conservazione a -20°C è di circa 2 settimane, mentre di 6 mesi a temperature inferiori a -70°C. Si consiglia un processo di scongelamento rapido (ad esempio lascian-

do i campioni a 37°C) e di eseguire immediatamente i test entro massimo due ore dallo scongelamento conservando il plasma a 4°C. Il ricongelamento dei campioni deve essere evitato per la potenziale perdita di funzionalità delle proteine in esame.

Il PTT può risultare alterato in campioni congelati frequentemente per il decadimento dell'attività del FVIII.

Emolisi, lipemia, ittero

Le interferenze dei test di coagulazione dovute alla presenza di bilirubina, lipemia ed emolisi sono state valutate da pochi studi presenti in letteratura.

Emolisi

L'emolisi è il risultato del rilascio delle componenti intracellulari degli eritrociti, dei trombociti e dei leucociti nel liquido extracellulare. È visibile come colorazione rossa del plasma o del siero dopo centrifugazione del campione che corrisponde a concentrazioni di emoglobina libera comprese tra 100 e 300 mg/L. Può essere definita come "fattore biologico interferente" laddove interviene "in vivo"; mentre è un'importante variabile preanalitica se si verifica durante o dopo la raccolta del campione. Il processo emolitico ed in particolare i processi di trombocitolisi e granulocitolisi possono influenzare significativamente i test coagulativi, per attivazione diretta del sistema emostatico.

Campioni con emolisi visibile devono quindi essere scartati a causa di una possibile attivazione dei fattori della coagulazione e della conseguente variabilità dei risultati.

Ittero e Lipemia

Elevate concentrazioni di bilirubina e di trigliceridi possono causare variazione nei risultati sia dei test globali che specifici dell'emostasi. In particolare si possono osservare importanti variazioni dipendenti dal sistema di rilevazione del coagulo, sia esso di tipo magneto-meccanico che foto ottico.

Considerazioni conclusive

A tutti i Laboratori di Coagulazione viene raccomandato di prestare particolare attenzione alla fase pre-analitica, di organizzare il controllo delle diverse fasi del processo ed una adeguata formazione del personale addetto.

Proprio perchè le variabili pre-analitiche rappresentano la causa più frequente di errore di risultato nei test di laboratorio, con possibili gravi conseguenze nella gestione del malato nonché un importante aumento dei costi si consiglia di ripetere il prelievo in caso di:

- campioni coagulati
- campioni raccolti in provette non adeguate

- campioni che presentano un difetto di riempimento pari al 10%
- campioni che non arrivino nelle condizioni termiche ottimali per la determinazione dell'esame richiesto (ad es FVIII in ghiaccio fondente a 4°C)
- campioni emolisati
- per campioni itterici o lipemici valutare criticamente i test o lipemici

Sono in corso le elaborazioni di lavori originali del GdS Coagulazione della SimeL sulle interferenze legate ad alcune variabili preanalitiche , in prossima pubblicazione, nonché l'analisi dettagliata dei singoli esami richiesti nello studio delle malattie emorragiche e tromboemboliche

Bibliografia

1. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing. Dependence on citrate concentration. Am J Clin Pathol 1998; 109: 595-9.
2. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. Blood Coag Fibrinolysis 1998; 9: 463-70.
3. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3,2% vs. 3,8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. Am J Clin Pathol. 1997; 107: 105-10.
4. Grafmeyer D, Bondon M, Machon M, Levillain R, The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analyzers. Eur J Clin Chem Biochem 1995; 33:31-52.
5. Koepke JA, Rodgers JL, Ollivier MJ. Pre-instrumental variables in coagulation testing. Am J Clin Pathol 1975; 64:591-96.
6. NCCLS. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays, Approved Guidelines-Third Edition. NCCLS document H21-A3.1998 NCCLS, Wayne, PA.
7. NCCLS. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimen by Venipuncture; Approved Guidelines- Fourth Edition. NCCLS document H3-A4.1998 NCCLS, Wayne, PA.
8. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. Clin Chem 1997; 43:1348-51.
9. Reneke J, Ezzell J, Leslie S, et al. Prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time due to underfilled specimen tubes with 109 mmol/l (3,2%) citrate anticoagulant. Am J Clin Pathol 1998; 109: 754-57.
10. Tripodi A. Le variabili preanalitiche nello studio dell'emostasi. Biochimica Clinica 1989; 13:441-5.

Gruppo di Studio in Coagulazione SIMeL (GdS SIMeL Coag)

- Adriano Alatri Centro Emostasi e Trombosi, Istituto di Patologia Clinica AO "Istituti Ospitalieri" Cremona
- Giovanna Antonucci-Ospedale S. Giovanna Addolorata Roma
- Rossella Bader Centro Emofilia e Trombosi Bianchi Bonomi, Policlinico di Milano
- Ettore Intra Laboratorio Analisi Ospedale Evangelico Internazionale di Genova
- Franco Manzato Laboratorio Analisi Ospedale di Mantova
- Giuliana Martini-II Laboratrio Spedali Civili Brescia
- Simona Pedrini, Laboratorio Analisi, Clinica Poliambulanza Brescia
- Sophie Testa, Centro Emostasi e Trombosi, Istituto di Patologia Clinica AO "Istituti Ospitalieri" Cremona