

La variabilità preanalitica in coagulazione

Benedetto Morelli¹, Barbara Montaruli², Daniela Cabodi³, Alice Appiani⁴, Federica Bertone⁵, Valter Conterio⁶, Marta Sofia Demicheli⁷, Emanuela Muccini⁸, Chiara Novelli⁹, Maria Rita Portalupi⁴, Paola Pradella¹⁰, Simone Prestigio¹¹ per il Gruppo di Studio Emostasi

¹Laboratorio Analisi Synlab Castenedolo, Brescia

²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Azienda Ospedaliera Ordine Mauriziano, Torino

³Laboratorio Analisi, Ospedale San Giovanni Bosco, Azienda Sanitaria Locale Città di Torino

⁴Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara

⁵Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliera Santa Croce e Carle, Cuneo

⁶Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, ASLCN2 Alba-Bra

⁷Laboratorio Studio Malattie Emorragiche e Trombotiche, AO SS. Antonio e Biagio, Alessandria

⁸Struttura Complessa Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero Universitaria Città della Salute e della Scienza, Presidio Ospedaliero Molinette, Torino

⁹Immunoematologia e Centro Trasfusionale ASST Ovest Milanese, Legnano, Milano

¹⁰Servizio di Medicina Trasfusionale, Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Trieste

¹¹Struttura Complessa Laboratorio Analisi, Ospedale di Ivrea - ASLTO4, Ivrea

ABSTRACT

Pre-analytical issues in coagulation testing. Poor standardization of preanalytic variables influences greatly the reliability of coagulation testing, consuming health care resources and compromising patient outcomes. These variables include patient preparation, sample collection, handling, transportation, processing, and storage until time of analysis: lack of standardized procedures for sample collection accounts for most of the errors encountered within the total testing process. Most pre-analytical problems may arise from system faults and insufficient audit of the operators involved in specimen collection and handling, leading to unsuitable specimens due to misidentification, hemolysis, clotting, inappropriate volume, wrong container, contamination from the infusive route. Detection, acknowledgement and management of pre-analytical variables, is mandatory for delivering accurate laboratory results. The present document, issued by the Study Group on Haemostasis of the Italian Society of Laboratory Medicine, is a summary of the recommendations for standardisation of the pre-analytical phase of the coagulation testing, related to sample collection, transportation, and storage and provides guidance to reduce the effects of pre-analytical issues that can have a significant impact on patient care.

INTRODUZIONE

Assicurare la qualità totale nella diagnostica di laboratorio rappresenta un requisito necessario per il conseguimento di risultati attendibili. In emostasi, più che in altri settori della medicina di laboratorio, la qualità è determinata dalla fase preanalitica. Il termine "fase preanalitica" descrive tutte le azioni e gli aspetti delle procedure diagnostiche di medicina di laboratorio che avvengono prima della fase analitica. Essa rappresenta pertanto una parte della qualità totale della diagnostica coagulativa e comprende fattori di variabilità che possono intervenire sul campione durante la raccolta di sangue, la preparazione, il trasporto e la conservazione,

e che ne possono alterare il risultato. La mancanza di procedure standardizzate per il corretto trattamento preliminare dei campioni può avere conseguenze cliniche significative sulla gestione dei pazienti, soprattutto quando l'errore coinvolge esami specialistici, spesso considerati diagnostici, ed esami utilizzati per monitorare l'efficacia e la sicurezza delle terapie anticoagulanti. Il controllo delle variabili preanalitiche in coagulazione è essenziale poiché esso ha influenza diretta sulla qualità dei risultati e sulla loro affidabilità clinica. L'accurata standardizzazione della fase preanalitica è di importanza cruciale per ottenere risultati affidabili in questo campo e ridurne gli effetti collaterali

Corrispondenza a: Benedetto Morelli, Laboratorio Analisi Synlab, Via Beato L. Pavoni 18, 25014 Castenedolo (Brescia), Italy, Tel: 340 7912302, E-mail: benemorelli47@gmail.com

Ricevuto: 19.02.2019

Revisionato: 20.02.2019

Accettato: 27.02.2019

Pubblicato on-line: 29.04.2019

DOI: 10.19186/BC_2019.024

(1-7). Questo documento rappresenta una sintesi delle raccomandazioni più importanti riguardanti l'importanza dei fattori preanalitici per gli esami di coagulazione e, nelle intenzioni degli autori dovrebbe essere uno strumento per aumentare la consapevolezza dell'importanza del costante controllo della variabilità preanalitica in coagulazione.

PRELIEVO DEL CAMPIONE

Il prelievo di sangue è una delle criticità maggiori della fase preanalitica, soprattutto in coagulazione dove la raccolta di campioni idonei è fondamentale per ottenere risultati attendibili. È quindi necessario che tutti i prelevatori, sia quelli interni costituiti da personale del laboratorio sia quelli esterni, ricevano una formazione adeguata, che consenta loro di conoscere l'impatto che il prelievo ha sulla qualità del risultato analitico e tutte le informazioni necessarie all'esecuzione di un corretto prelievo (1-8).

Modalità di prelievo

Per gli esami di coagulazione le provette da utilizzare per il prelievo devono essere di vetro siliconato o polipropilene, e devono contenere sodio citrato come anticoagulante. Le provette devono essere sottovuote e marchiate CE.

In accordo con le raccomandazioni EFLM l'etichettatura delle provette deve essere sempre eseguita in presenza del paziente. Malgrado non siano fornite indicazioni univoche, si ritiene altresì opportuno sottolineare che l'etichettatura delle provette andrebbe eseguita prima dell'esecuzione del prelievo. Le etichette devono riportare come minimo: nome completo del paziente, data di nascita, codice numerico univoco e data del campionamento (9-10)¹.

Il prelievo deve essere eseguito con l'utilizzo di dispositivi sterili e apirogeni, basati su camicia monouso e ago diritto di sicurezza, di cui devono essere sempre verificate, prima del loro utilizzo, data di scadenza e integrità (8). Non è raccomandato l'utilizzo di sistemi *butterfly*, malgrado non siano evidenziabili variazioni significative negli esami di emostasi associate all'uso dei suddetti dispositivi. Il loro utilizzo dovrebbe essere comunque scoraggiato in quanto questi, oltre a possedere un costo superiore ai dispositivi convenzionali, hanno una maggiore probabilità di creare campioni non idonei (scarsi o emolizzati), di attivare la fase di contatto dell'emostasi o indurre aggregazione piastrinica (1,10-12).

Un altro problema importante è rappresentato dal calibro degli aghi utilizzati per il prelievo. Le dimensioni raccomandate sono fra 19 e 21 gauge (G); aghi con calibro troppo piccolo (inferiori a 25 G) o troppo grande (maggiore di 16 G) possono indurre, a causa del delta differenziale delle forze di aspirazione, lisi degli eritrociti

e attivazione piastrinica (11).

Il prelievo deve essere effettuato con il paziente seduto in modo comodo su una poltrona, o sdraiato con il braccio posizionato orizzontalmente o leggermente inclinato verso il basso, ben appoggiato. La poltrona e il letto devono garantire la sicurezza del paziente in caso di perdita di conoscenza (2,8,10,12). La sede di prelievo da preferire è la fossa antecubitale; nel caso non fosse possibile reperire vene agevoli in quel punto, sono accettabili anche prelievi effettuati sul dorso della mano. Scelta la vena da utilizzare, si deve procedere con la disinfezione della cute evitando l'uso di alcool in quanto produce iperemia (2). Il prelievo deve essere eseguito dall'operatore indossando i guanti e rispettando le indicazioni di sicurezza.

L'applicazione del laccio emostatico non deve superare il minuto di permanenza e il paziente può chiudere il pugno (evitando però di aprirlo e chiuderlo) onde facilitare l'identificazione della vena migliore (13). Il laccio emostatico deve essere allentato subito dopo il riempimento della prima provetta allo scopo di evitare l'attivazione piastrinica; la stasi venosa può portare ad emolisi in vitro e determinare emocoagulazione, con conseguente aumento del fibrinogeno e dei fattori della coagulazione II, VII e XII (1,6,8,12).

Qualora sia necessario effettuare prelievi da pazienti con cateteri venosi a permanenza o accessi centrali con infusione, è consigliabile effettuare il prelievo da siti lontani dalla sede dell'infusione onde evitare contaminazioni del campione con soluzioni di infusione presenti nei dispositivi utilizzati. Nel caso non sia possibile prelevare i campioni da siti diversi rispetto a quello di inserzione del dispositivo, se si deve effettuare un prelievo da catetere a permanenza è obbligatorio eliminare i primi di 5-10 mL di sangue o effettuare un lavaggio del dispositivo con soluzione fisiologica per diminuire gli effetti della contaminazione (1,2,6).

Nel caso di prelievi che richiedano l'utilizzo di una siringa classica, è necessario impiegare dispositivi di volume non superiore a 20 mL ed effettuare il trasferimento del campione in provette idonee delicatamente, dopo aver eliminato l'ago, entro il minor tempo possibile e senza dare origine a fenomeni di emolisi (1).

Nel 2017, il Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ha emanato la versione semplificata dell'ordine di prelevamento delle provette (2), atto ad evitare eventuali contaminazioni dovute ad effetto di trascinamento di anticoagulanti diversi rispetto al sodio citrato (1,6,9). L'ordine di prelievo prevede in sequenza la raccolta del sangue in flaconi per emocoltura, provette per esami di coagulazione contenenti sodio citrato, provette per siero con o senza attivatori e con o senza gel siliconico, provette con eparina con o senza gel separatore, provette con EDTA, provette con inibitori della glicolisi, eventuali altre provette (10)¹. Quando la provetta di coagulazione viene raccolta come prima o unica

¹ Delle raccomandazioni EFLM (10) è disponibile la traduzione Italiana pubblicata su *Biochim Clin* 2019;10.19186/BC_2019.012

provetta, se viene utilizzato un set per il prelievo di sangue (dispositivi a farfalla), deve essere prelevata una provetta di scarto per prevenire il sotto-riempimento della provetta con conseguente alterazione dei risultati degli esami (1,10,14).

Dopo il prelievo, il campione deve essere miscelato in modo corretto effettuando da 3 a 6 inversioni complete della provetta (secondo le indicazioni della ditta produttrice) onde permettere l'azione efficace dell'anticoagulante. Questa operazione previene la formazione di coaguli e deve essere eseguita evitando scuotimenti o agitazioni vigorose che possono portare ad emolisi, ad attivazione delle piastrine o dei fattori della coagulazione (1,6).

Variabili da controllare durante la raccolta del campione

Allo scopo di ridurre al minimo le interferenze e la scorretta interpretazione dei risultati di laboratorio degli esami di emocoagulazione, il prelievo di sangue dovrebbe essere effettuato nelle prime ore del mattino, in soggetti a digiuno dalla mezzanotte, che non abbiano fumato e non abbiano effettuato attività fisica nelle due ore precedenti il prelievo (6-10).

La dieta ed il fumo sono fattori che influenzano in maniera significativa un elevato numero di analisi. I pazienti non dovrebbero effettuare il prelievo subito dopo un pasto ricco di grassi allo scopo di evitare la formazione nel plasma di chilomicroni che possono interferire sulla lettura di molti esami di laboratorio. Un pasto leggero non sembra influenzare i risultati degli esami di primo livello della coagulazione.

La caffeina aumenta l'attività fibrinolitica, mentre il cioccolato attiva l'aggregazione piastrinica a causa della teobromina contenuta nel cacao (6,8). L'astensione dal fumo due ore prima del prelievo è consigliata per evitare una possibile stimolazione dell'aggregazione piastrinica (6,8).

L'esercizio fisico influisce sulla concentrazione del fattore VIII e del fattore von Willebrand, determinato sia con metodica immunologica (vWF:Ag) che funzionale (vWF:RCo), in modo significativo fino a 10 ore dopo l'esercizio ed in maniera proporzionale all'intensità dell'esercizio stesso. La fibrinolisi globale aumenta durante l'esercizio ed immediatamente dopo, per tornare normale in breve tempo. La concentrazione del D-dimero aumenta velocemente e perdura su valori superiori alla norma fino ad un'ora dopo la conclusione dell'esercizio fisico (6,8).

Lo stress (per esempio nei bambini irrequieti) dovrebbe essere evitato, se possibile, in tutte le circostanze, in quanto alcuni studi hanno evidenziato un aumento della attività o della concentrazione di alcuni fattori della coagulazione, come il fattore VIII, il fattore von Willebrand, espresso sia come concentrazione immunologica (vWF:Ag) che come attività (vWF:RCo), e il fibrinogeno. Uno stress prolungato sembra poter indurre un aumento anche dei fattori V e IX (6,8).

Anticoagulante

L'anticoagulante di scelta per il prelievo dei campioni dedicati agli esami di emostasi è il citrato trisodico (biidrato), in quanto solo l'utilizzo di questo anticoagulante consente la ricalcificazione del plasma. Le concentrazioni disponibili in commercio sono due: 3,8% (0,129 mmol/L) e 3,2% (0,109 mmol/L). Le più recenti evidenze della letteratura dimostrano come concentrazioni diverse di anticoagulante possono determinare risultati degli esami coagulativi significativamente differenti. Per quanto concerne la concentrazione dell'anticoagulante nel tubo primario, il documento CLSI H21-A5 (1) raccomanda l'utilizzo di provette contenenti sodio citrato alla concentrazione di 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L). È stato dimostrato come, per la determinazione del tempo di protrombina (PT) ai fini del controllo della terapia anticoagulante orale, il valore di International Sensitivity Index (ISI) assegnato alla tromboplastina dipenda dalla concentrazione del sodio citrato utilizzato per il prelievo. In particolare, concentrazioni maggiori di sodio citrato determinano valori di ISI più bassi della tromboplastina (15). Dati della letteratura dimostrano inoltre, che l'utilizzo di provette contenenti citrato trisodico alla concentrazione di 3,8 % (0,129 mmol/L), determina un prolungamento del PT e del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) e una sottostima del fibrinogeno, perché i valori di riferimento di queste determinazioni sono ottenuti utilizzando campioni con concentrazione 3,2% (0,109 mmol/L) di citrato trisodico (6,16).

Alcuni autori hanno evidenziato un effetto interferente degli ioni magnesio presenti come contaminante del sodio citrato. Esistono in commercio provette a basso contenuto di magnesio e la loro comparazione con provette ad elevato contenuto di ioni magnesio ha mostrato una differenza significativa dei risultati del PT-INR determinato con tromboplastine ricombinanti; questo non avviene con le tromboplastine di estrazione (1). Resta quindi aperto il problema del tipo di anticoagulante utilizzato dall'industria nella determinazione dell'ISI. Infatti, se i campioni utilizzati sono prelevati con sistemi a basso contenuto di magnesio, essi si associano ad un ISI inferiore. Stessa considerazione può essere fatta per i plasmi certificati per la determinazione "locale" dell'ISI, anch'essi non esenti da errori preanalitici (18).

I campioni per gli esami di emostasi, a causa della centralizzazione delle analisi in laboratori *hub*, possono giungere dagli ospedali satelliti *spoke*, già aliquotati e congelati. Un problema emergente è, quindi, il riconoscimento della matrice dei campioni secondari prodotti in centri prelievi decentralizzati. In presenza di risultati dubbi o inattendibili deve essere sempre considerata la possibilità che il campione in analisi non sia plasma citrato ma siero, plasma eparinato o plasma EDTA. Nella Tabella 1 è riportato l'effetto matrice sui principali esami coagulativi (4).

Nel caso di dubbi sulla matrice dell'aliquota in esame

la determinazione di sodio, potassio, cloro, calcio e magnesio consente di distinguere con efficienza pari al 100% il plasma citrato dal plasma EDTA, plasma eparinato o siero (vedi Tabella 2).

Rapporto sangue-anticoagulante

Un'altra fonte di variabilità preanalitica, che interferisce sensibilmente sulla qualità del risultato, è rappresentata dal riempimento non ottimale della provetta. Campioni insufficienti per quantità sono, infatti, ritenuti non idonei ad essere processati (1).

Il sodio citrato, anticoagulante di scelta usato per gli esami di coagulazione, è presente solo in forma liquida e il rapporto sangue-anticoagulante raccomandato per un corretto riempimento della provetta è di 9 parti di sangue e 1 parte di anticoagulante (9:1). Se questo rapporto è inferiore a quanto raccomandato, il sodio citrato in eccesso provocherà la diluizione del plasma utilizzato nell'esecuzione dell'esame e legherà non soltanto il calcio presente nel campione, ma anche quello introdotto nella miscela di reazione indispensabile alla formazione del coagulo, determinando un

allungamento dei tempi di coagulazione, con risultati dell'esame potenzialmente inaccurati (1,6,19). Analoghe considerazioni possono essere fatte in merito ai campioni ottenuti da soggetti con ematocrito elevato, come viene discusso in un'altra sezione di questo documento. Nel corso degli anni, vari studi sono stati condotti, per valutare il volume minimo necessario per ottenere risultati affidabili, soprattutto per gli esami di screening coagulativo PT e APTT, tenendo in considerazione la concentrazione dell'anticoagulante e le dimensioni dei contenitori. Dai dati della letteratura emerge che, per non alterare in modo significativo i risultati di PT e APTT, il volume minimo di riempimento per provette da 5 mL contenenti sodio citrato 3,8% (0,129 mmol/L) è rispettivamente 80% e 90% del volume nominale, mentre con sodio citrato 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L) il volume minimo richiesto è decisamente più basso, rispettivamente il 60% e 70% del volume totale (16). Anche la capacità delle provette può influire sui risultati dell'esame. È stato più volte riportato che, con provette da 3,6 mL contenenti sodio citrato 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L), il volume minimo di riempimento richiesto per PT e APTT è rispettivamente 67% e 90%

Tabella 1

Effetto matrice sui principali esami coagulativi.

Esame	Sodio citrato (3,2%; 0,109 mmol/L)	EDTA	Sodio eparina	Siero
Tempo di protrombina (secondi)	11,5-13,2	19-27	ND	ND
Tempo di tromboplastina parziale attivato (secondi)	25-33	45-92	ND	ND
Fattore V (%)	84-142	39-103	59-103	13-33
Fattore VII (%)	50-180	51-182	43-107	80-437
Fattore VIII (%)	80-202	2-19	<1	1,3-7,7
F IX (%)	97-148	63-168	<1	135-565
vWF:Ag (%)	50-194	59-228	42-98	32-169
vWF:RCo (%)	41-188	46-215	13-60	25-124
Proteina C coagulativa (%)	66-155	100-205	<1	0-70
Proteina S coagulativa (%)	73-119	17-42	<1	0-39,5
Proteina S libera antigene (%)	72-144	91-171	94-159	97-164
Antitrombina (%)	86-118	105-138	108-143	30-65

Tabella modificata dal riferimento 4. Intervalli di valori ottenuti su 10 volontari sani; campioni prelevati con additivi differenti. ND, non determinabile; vWF:Ag, fattore von Willebrand antigene; vWF:RCo, attività di cofattore ristocetinico del fattore von Willebrand.

Tabella 2

Concentrazione sodio, potassio, calcio, cloro e magnesio misurati sul plasma ricavato da provette con sodio citrato ed EDTA rispetto alle provette per siero o con sodio eparina.

	Sodio citrato (3,2%; 0,109 mmol/L)	EDTA
Sodio	↑↑↑	↓↓↓
Potassio	↓↓	>14 mmol/L
Calcio	↓↓	Indosabile
Cloro	↓↓	↓↓↓
Magnesio	↓↓	Indosabile

(3). È peraltro possibile che gli effetti conseguenti all'insufficiente riempimento possano dipendere anche dal materiale di cui è costituita la provetta, dal suo diametro interno, dallo spazio vuoto residuo dopo il riempimento, oltre che dalla composizione dei reattivi in uso (5,16). In ogni caso, non è stato finora identificato alcun modello matematico che consenta la valutazione del bias dei risultati in base alla riduzione del volume di sangue nelle provette (20).

Il documento CLSI H21-A5 (1) indica come processabili per tutti gli esami di coagulazione solo i campioni raccolti in sodio citrato 3,2% (0,109 mmol/L) contenenti almeno il 90% del volume previsto. Dati della letteratura più recenti suggeriscono l'adozione di misure meno stringenti, raccomandando che le provette di coagulazione siano riempite per almeno l'80% del loro volume nominale, senza distinzione per i singoli esami, allo scopo di non creare confusione quando sono richiesti contemporaneamente esami con diversa tolleranza nei confronti della carenza di volume (5,20). Un caso particolare è costituito dalle provette pediatriche, che sono spesso utilizzate anche per il controllo del PT-INR nei pazienti in terapia anticoagulante orale con antagonisti della vitamina K. In

questi casi bisogna porre attenzione all'esigua quantità di sangue prelevata; il volume minimo di riempimento consigliato è almeno il 90% del volume nominale (22).

È anche possibile un difetto di riempimento in senso contrario, cioè che un campione contenga un volume superiore al previsto, come può accadere quando il sangue è aggiunto alla provetta mediante una siringa e non sfruttando il vuoto. Anche in questo caso il rapporto tra l'anticoagulante e il sangue è inadeguato, e può portare all'attivazione dei processi coagulativi nel campione a causa del calcio residuo non legato dal sodio citrato presente in quantità insufficiente (18).

Poiché la quasi totalità degli studi condotti sull'effetto della diluizione riguarda gli esami coagulativi di primo livello, mentre sono pochissimi i dati in letteratura in merito agli esami di approfondimento (come ad esempio la determinazione dei fattori procoagulanti e degli inibitori naturali o ricerca del Lupus Anticoagulant), il GdS Emostasi di SIBioC suggerisce che l'esecuzione degli esami specialistici di coagulazione sia riservata a campioni raccolti in modo da garantire almeno il 90% del volume di riempimento previsto dalla tipologia della provetta.

Raccomandazioni per il prelievo di sangue

- Usare provette in vetro siliconato o polipropilene.
- L'anticoagulante da utilizzare deve essere il sodio citrato alla concentrazione 3,1-3,2% (0,105-0,109 mmol/L).
- Il prelievo deve essere effettuato nelle prime ore del mattino, con il paziente a digiuno dalla mezzanotte.
- Il paziente non dovrebbe essere stato sottoposto a sforzi fisici o psichici intensi nelle ore precedenti il prelievo.
- Riportare sulle etichette delle provette almeno: nome e cognome del paziente, data di nascita del paziente, data del prelievo, numero identificativo della provetta.
- Effettuare il prelievo sulla faccia volare dell'avambraccio in prossimità della fossa antecubitale.
- Il calibro dell'ago deve essere compreso fra i 19 e 22 G.
- Evitare l'utilizzo di aghi cannula in quanto possono più facilmente indurre emolisi.
- Il laccio emostatico non dovrebbe essere mantenuto più di 1 minuto in quanto la stasi venosa può alterare tutti i parametri coagulativi.
- L'ordine di prelievo prevede in sequenza:
 - flaconi per emocoltura
 - provette per esami di coagulazione contenenti sodio citrato
 - provette da siero con o senza attivatori e con o senza gel siliconico
 - provette con eparina con o senza gel
 - provette con EDTA
 - provette con inibitori della glicolisi
 - eventuali altre provette
- Dopo il prelievo mescolare delicatamente il campione, effettuando da 3 a 6 inversioni della provetta (seguendo le istruzioni del produttore) onde consentire l'azione efficace dell'anticoagulante. Evitare scuotimenti o agitazioni vigorose che possono portare ad emolisi, ad attivazione delle piastrine o dei fattori della coagulazione.
- Nel caso di prelievo da catetere a permanenza è obbligatorio eliminare i primi 5-10 mL di sangue o utilizzare per prime provette per siero (se richieste).
- Per tutti gli esami di coagulazione, sono accettabili solo i campioni contenenti almeno il 90% del volume previsto. Tuttavia per alcuni esami [PT, APTT, tempo di trombina (TT), fibrinogeno e antitrombina] si possono tollerare riempimenti leggermente inferiori, ma non oltre il limite di 80% del riempimento.
- Per i campioni provenienti già aliquotati da centri prelievi o ospedali decentralizzati, in caso di risultati dubbi o inattendibili (vedi tabelle 1 e 2) si raccomanda l'esecuzione del PT e del TT. Se il PT è incoagulabile e il rapporto del TT è >1,20 si può sospettare la presenza di un coagulo nel campione o una matrice non idonea (siero o sodio eparina) nel primo caso e contaminazione eparinica nel secondo. Si può eventualmente ricorrere alla determinazione anche di sodio/potassio/calcio/cloro e magnesio nel plasma per distinguere il plasma citrato dal plasma EDTA.

Ematocrito

Il rapporto standardizzato fra anticoagulante e sangue è di 1:9. In questo modo si ottiene, in un campione di sangue intero con ematocrito (HT) di 0,40 L/L, un rapporto anticoagulante/plasma di circa 1:6,4 che è ottimale nei confronti della successiva ricalcificazione. Questo rapporto è critico e può essere fonte di significativa variabilità del risultato, specialmente nei pazienti anticoagulati. I motivi più frequenti di un errato rapporto sono gli eccessi o più spesso i difetti di riempimento della provetta e le alterazioni marcate dell'HT. Nei campioni con elevato HT (>0,55 L/L), il rapporto tra sangue e anticoagulante è inferiore a 9:1; ciò comporta una sovracitratazione del campione che causa un eccessivo legame del calcio per effetto della diluizione dell'anticoagulante. La sovracitratazione del campione e la eccessiva diluizione portano a significativi allungamenti dei tempi di formazione del coagulo, determinando prolungamento degli esami di screening e diminuzione delle misure dei fattori procoagulanti (23). Al contrario, valori di HT fortemente diminuiti (<0,20 L/L) determinano ipocitratazione del campione con accorciamento dei tempi di coagulazione ed espongono al rischio di coagulazione in provetta, prima dell'analisi (24). Mentre non vi sono indicazioni di aggiustamento della quantità di anticoagulante per i campioni di pazienti con HT <0,20 L/L, tutte le raccomandazioni (1,6,25) sono invece d'accordo sulla necessità di operare un aggiustamento della quantità di sodio citrato se HT è >0,55 L/L.

Per calcolare la quantità di sodio citrato da utilizzare nel caso di pazienti con ematocrito >0,55 L/L possono essere utilizzate formule o nomogrammi (1,5,23-26).
- Formula di Ingram (5):

$$X = [(1-HT)/(5,95-HT)] \times V$$

dove X è il volume, in mL, di sodio citrato e V è il volume della provetta.

- Formula di McGann (1):

$$X = (1,85 \times 10^{-3}) \times (1-HT) \times (V)$$

dove X è il volume di citrato nella provetta, V il sangue che viene aggiunto e $1,85 \times 10^{-3}$ è una costante.
- Nomogramma consultabile nella appendice del documento H21-A5 di CLSI (1). Nel nomogramma sono indicate le quantità di sodio citrato sull'asse delle ordinate, i valori di HT sull'asse delle ascisse e quattro diversi formati di provette (da 10, 5, 2 e 1 mL). Dal nomogramma risulta evidente che in soggetti con valori di HT particolarmente elevati (ad esempio 0,62 L/L), prendendo in considerazione la provetta da 5 mL, la quantità di citrato che deve essere presente nella provetta non è 0,5, ma solo 0,3 mL.

Raccomandazioni per i campioni con valori di ematocrito >0,55 L/L

Per i pazienti che hanno valori di ematocrito > 0,55 L/L è necessario utilizzare provette contenenti una quantità ridotta di anticoagulante [sodio citrato al 3,2% (0,109 mmol/L)], calcolata secondo una delle modalità sopra riportate.

TRASPORTO

Dopo essere stati prelevati, i campioni di sangue per gli esami di coagulazione devono essere trasportati in laboratorio. L'immediata centrifugazione e lavorazione costituiscono il modo ottimale di procedere. Poiché non sempre l'organizzazione del lavoro lo consente, sono stati eseguiti numerosi studi atti a valutare la stabilità dei campioni dedicati ai test dell'emostasi. È noto dalla letteratura che l'intervallo di tempo consentito fra il prelievo del campione e l'esecuzione dell'analisi varia in funzione del tipo di esame di coagulazione da eseguire, del tempo che intercorre fra il prelievo e la separazione del plasma dalla parte corpuscolata e della temperatura di conservazione prima e dopo la centrifugazione.

I campioni che dagli ospedali (o centri di prelievo) satelliti giungono ai laboratori degli ospedali centrali vengono spesso inviati non centrifugati. Questo è un enorme vantaggio in quanto i laboratori riceventi possono valutare sulle provette primarie variabili preanalitiche importantissime, quali il corretto riempimento della provetta, la presenza di coaguli, l'entità di HT e l'utilizzo del corretto tipo di anticoagulante per il prelievo (1-7).

Allo scopo di mantenere il massimo livello di integrità, i campioni non centrifugati per l'esecuzione di esami di coagulazione di primo livello dovrebbero arrivare in laboratorio entro 6 ore dal prelievo e entro 4 ore per gli esami di coagulazione specialistica (1-7).

La provetta primaria deve giungere in laboratorio tappata, e come tale deve rimanere fino al momento dell'analisi onde evitare variazioni di pH dovute alla liberazione di anidride carbonica a contatto con l'aria (1-7).

Estremi di temperatura devono essere evitati durante il trasporto delle provette non centrifugate. La conservazione e il trasporto delle provette primarie a temperature di 2-8°C o a diretto contatto con il ghiaccio, determina infatti non solo attivazione delle piastrine e del fattore VII, ma anche una significativa riduzione del fattore VIII e del fattore von Willebrand (1,4,6). Dati della letteratura dimostrano infatti che provette di sangue intero prelevate in sodio citrato e conservate per circa 3 ore a diretto contatto con il ghiaccio portano ad una riduzione fino al 50% del fattore VIII e del fattore von Willebrand, associandosi in questi pazienti ad una diagnosi errata di emofilia A o di malattia di von Willebrand (2,12). La conservazione e il trasporto delle provette primarie a temperature elevate (56°C) porta a perdita di attività da parte di tutti i fattori della coagulazione (4,27).

I campioni di sangue intero devono quindi essere mantenuti a temperatura ambiente (15°-25°C), senza essere sottoposti ad eccessiva agitazione.

Il trasporto mediante posta pneumatica delle provette è generalmente consentito, a patto che il sistema di posta pneumatica non induca una eccessiva vibrazione o shock durante il trasporto, o che le provette siano sottoposte ad una eccessiva forza di gravità nel momento della accelerazione/decelerazione delle

provette o dei bossoli, al fine di evitare attivazione piastrinica (29). I campioni di sangue per gli studi di funzionalità piastrinica non devono essere, quindi, trasportati mediante posta pneumatica a causa della possibile attivazione piastrinica (29,30).

Nelle Tabelle 3 e 4 vengono riportate, per gli esami di primo e secondo livello, le raccomandazioni del documento CLSI H21-A5 (1) e della letteratura più recente sulla stabilità dei campioni di sangue intero (Tabella 3) e del plasma povero di piastrine (PPP) (Tabella 4) a diverse temperature. Nelle Tabelle vengono anche indicate le condizioni di stabilità suggerite dal Gruppo di Studio Emostasi di SIBioC (1, 31-41).

Nel caso in cui gli esami non possano essere eseguiti entro i tempi indicati, è necessario provvedere alla loro conservazione mediante congelamento rapido del plasma (preferibilmente utilizzando azoto liquido). Il

congelamento di campioni di sangue intero non risulta accettabile, poiché esso determinerebbe emolisi massiva.

Contenitori da utilizzare per la conservazione del plasma

Il contenitore e il volume da utilizzare per la conservazione possono influire sulla stabilità del campione. Le provette devono essere di materiale inerte come polipropilene (da evitare il polistirene che non è adatto a queste determinazioni). Il volume conservato non deve essere superiore a 1 mL con il minor spazio morto possibile onde consentire un congelamento rapido (1,4,6). Possono essere utilizzate provette con il tappo a pressione o a vite, poiché le differenze riscontrate nei risultati degli esami eseguiti dopo scongelamento con le due tipologie di contenitore non appaiono clinicamente rilevanti (11).

Tabella 3

Stabilità dei campioni di sangue non centrifugati.

Esame	Sangue intero 18-25°C (riferimento 1)	Sangue intero 15-25°C (riferimenti 2-8)	Sangue intero 15-25°C Proposta GdS SIBioC	Sangue intero refrigerato 4°C
Tempo di protrombina	24 ore	24-72 ore	24 ore	NG
Tempo di tromboplastina parziale attivato	4 ore	18-24 ore	6 ore	NG
Tempo di trombina	4 ore	24 ore	24 ore	NG
Attività anti-fattore Xa per determinazione EBPM	4 ore	24 ore	4 ore	NG
Fattori V, VIII	4 ore	24 ore	4 ore	NG
Fattori II, VII, IX, X, XI, XII	4 ore	48 ore	4 ore	NG
vWF:Ag, vWF:RCo	4 ore	24-48 ore	4 ore	NG
Fibrinogeno	4 ore	48 ore-7 giorni	24 ore	NG
D-Dimero	4 ore	48 ore	24 ore	NG
Antitrombina (attività)	4 ore	48 ore-7 giorni	24 ore	NG
Proteina C (attività)	4 ore	48 ore	24 ore	NG
Proteina S (attività)	4 ore	4-6 ore	24 ore	NG
Lupus Anticoagulant e inibitori dei fattori della coagulazione	4 ore	8 ore	6 ore	NG
Farmaci anticoagulanti orali diretti				
Dabigatran (dTT)	NI	2 ore	2 ore	NG
Rivaroxaban (Anti-Xa)	NI	2 ore	2 ore	NG
Apixaban (Anti-Xa)	NI	2 ore	2 ore	NG
Edoxaban (Anti-Xa)	NI	2 ore	2 ore	NG

NG, stabilità non garantita; EBPM, eparine a basso peso molecolare; vWF:Ag, fattore von Willebrand antigene; vWF:RCo, attività di cofattore ristocetinico del fattore von Willebrand; dTT, tempo di trombina su plasma diluito; Anti-Xa, anti fattore X attivato; NI, non incluso.

Tabella 4

Condizioni di stabilità del plasma povero di piastrine congelato. Limiti suggeriti dal GdS Emostasi di SIBioC.

Esame	PPP Congelato e conservato a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$	PPP Congelato e conservato a $-70 \pm 2^\circ\text{C}$
Tempo di protrombina	14 giorni	12 mesi
Tempo di tromboplastina parziale attivato	14 giorni	12 mesi
Tempo di trombina	3 mesi	20 mesi
Fattore II, V, VII, X	14 giorni	6 mesi
Fattore VIII, IX, XI, XII	14 giorni	6 mesi
vWF:Ag, vWF:RCo	14 giorni	6 mesi
Fibrinogeno	18 mesi	24 mesi
D-Dimero	24 mesi	24 mesi
Antitrombina	3 mesi	24 mesi
Proteina C	14 giorni	6 mesi
Proteina S	14 giorni	6 mesi
Lupus Anticoagulant	14 giorni	6 mesi
Farmaci anticoagulanti orali diretti		
Dabigatran (dTT)	1 mese	ND
Rivaroxaban (anti-Xa)	1 mese	ND
Apixaban (anti-Xa)	1 mese	ND
Edoxaban (anti-Xa)	ND	ND

PPP, plasma povero di piastrine; vWF:Ag, fattore von Willebrand antigene; vWF:RCo, attività di cofattore ristocetinico del fattore von Willebrand; dTT, tempo di trombina su plasma diluito; Anti-Xa, anti fattore X attivato; ND, non disponibili.

Modalità di congelamento

Il congelamento deve essere il più rapido possibile e la procedura "gold standard" è rappresentata dall'utilizzo di azoto liquido (4). In alternativa può essere utilizzato un congelatore a $-70/-80^\circ\text{C}$. Ottenuto il congelamento, i campioni devono essere conservati preferibilmente a -70°C o a temperature inferiori; se non si dispone di un congelatore a questa temperatura è accettabile il congelamento a -20°C , che non consente tuttavia una conservazione per tempi lunghi come quelli che si possono ottenere col congelatore a -70°C (vedi Tabella 3). L'utilizzo di congelatori a -20°C dotati di sistema automatico di scongelamento è fortemente sconsigliato poiché potrebbe indurre attivazione del fattore VII e degradazione degli altri fattori (5,6).

Nel caso in cui sia necessario trasportare le aliquote congelate è possibile utilizzare ghiaccio secco o altro sistema che consenta il mantenimento del campione correttamente congelato.

Raccomandazioni sul trasporto e la conservazione

Provette primarie

- Devono pervenire in laboratorio entro i tempi indicati nella Tabella 3.

- Devono essere trasportate senza subire traumi fisici e conservate a temperatura ambiente ($15-25^\circ\text{C}$) fino al momento del loro processamento.

- Devono essere mantenute tappate fino al momento del loro processamento onde evitare variazioni di pH.

- Il trasporto mediante posta pneumatica è consentito purché non induca una eccessiva vibrazione (da verificare con prove in doppio) ed è comunque sconsigliato per i test di funzionalità piastrinica.

Aliquote secondarie di plasma

- Il plasma deve essere preparato secondo le modalità di centrifugazione riportate nel capitolo successivo.

- Utilizzare contenitori di polipropilene.

- Volume massimo delle aliquote: 1 mL.

- Congelare le aliquote il più velocemente possibile e conservarle a -70°C; il congelamento e la conservazione a -20°C non sono altrettanto efficaci e si associano a stabilità significativamente inferiore

- Trasportare le aliquote di plasma in ghiaccio secco o in contenitori atti a mantenere una temperatura di -20°C.

CENTRIFUGAZIONE

La maggior parte degli esami che indagano l'emostasi deve essere eseguita su plasma povero di piastrine (PPP); solo una piccola parte è eseguita su plasma ricco di piastrine (PRP) (studi di funzionalità piastrinica) o su sangue intero (esami viscoelastici).

La centrifugazione serve ad ottenere un plasma il più povero possibile di piastrine e di microparticelle, in quanto entrambe possono produrre, se presenti, tempi di coagulazione significativamente accorciati (4). Nella maggior parte delle Linee Guida viene definita una soglia massima di $<10 \times 10^9/L$ piastrine (1,6,42) nel plasma. Per la verifica del corretto funzionamento della centrifuga, la conta piastrinica sul PPP, eseguita con un contaglobuli, deve essere ripetuta periodicamente - ogni 6 mesi secondo la raccomandazione del *French Study Group on Hemostasis and Thrombosis* (GFTH) (42) - e registrata. Alcuni lavori hanno recentemente dimostrato che alcuni esami di base (PT, APTT, fibrinogeno e D-dimero) possono essere eseguiti anche su plasmici contenenti quantità elevate di piastrine ($>200 \times 10^9/L$), purché eseguiti immediatamente dopo la centrifugazione, anche se questi campioni non possono essere poi utilizzati per la preparazione di aliquote secondarie (6,43,44).

Le procedure di centrifugazione devono essere avviate nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo o dell'arrivo in laboratorio delle provette di coagulazione, soprattutto se le analisi vengono eseguite presso laboratori decentrati (*spoke*).

La centrifugazione deve essere eseguita ad una temperatura compresa tra 15 e 25°C (6,43); ciò è tuttavia difficile da controllare, soprattutto nei laboratori con grandi carichi di lavoro. Possono essere usate centrifughe non refrigerate, purché non si surriscaldino al loro interno. In alternativa possono essere usate centrifughe refrigerate impostando la temperatura nell'intervallo sopra indicato (45). Ad ogni modo, tutte le centrifughe utilizzate all'interno di un laboratorio devono rispettare i medesimi criteri (tutte refrigerate o tutte non refrigerate) onde garantire la standardizzazione di questa fase di preparazione del plasma. Devono essere anche evitate temperature troppo basse, perché ciò può determinare attivazione delle piastrine e di alcuni fattori della coagulazione. Nondimeno temperature basse non sembrano inficiare gli esami di primo livello, purché essi vengano eseguiti subito dopo la centrifugazione.

Secondo le procedure suggerite nel citato documento CLSI, le provette devono essere centrifugate a 1 500 g o comunque secondo le indicazioni del produttore (1); velocità più alte sono generalmente

sconsigliate perché ciò può indurre attivazione piastrinica ed emolisi. Tuttavia alcuni studi, che hanno preso in esame velocità più elevate (sino a 11 000 g) e tempi di centrifugazione più corti (sino a 2 minuti) (45,46), hanno dimostrato che non vi sono differenze significative a carico di PT, APTT e fibrinogeno, purché queste determinazioni vengano eseguite entro 10 minuti dalla fine della centrifugazione. In questi casi anche l'aliquotazione in provette secondarie e il congelamento rapido per l'esecuzione successiva di altri esami deve avvenire immediatamente dopo la centrifugazione. Velocità più basse ($<1 500 g$) sono, invece, fortemente sconsigliate perché non in grado di operare una corretta sedimentazione delle piastrine e delle microparticelle.

Nel caso di indicazione sul display della centrifuga della sola indicazione "rotazioni per minuto" (rpm), applicare la formula:

$$RCF (g) = 1,12 \times radius \times (rpm/1000)^2$$

dove, g = Relative Centrifugal Force (RCF), radius = raggio del rotore, rpm = rotazioni al minuto.

Secondo le procedure suggerite dal documento CLSI (1), le provette devono essere centrifugate per almeno 15 minuti. Tuttavia, possono essere utilizzati tempi più brevi, purché associati ad una velocità superiore. Ciò riveste particolare importanza per gli esami da eseguire in regime di urgenza/emergenza (PT, APTT, fibrinogeno e D-dimero) dove i tempi di risposta (TAT) devono essere ridotti al minimo indispensabile. Numerosi lavori sono stati proposti in letteratura, suggerendo di volta in volta 10, 5 sino ad arrivare a 2 minuti a 4 500 g (44-50). Qualora venissero adottati in laboratorio tempi di centrifugazione più brevi di 15 minuti, gli esami di coagulazione devono essere tassativamente eseguiti entro 10 minuti dal termine della centrifugazione e la stessa precauzione deve essere adottata nel caso in cui fosse necessaria la preparazione di aliquote secondarie. La raccomandazione del GdS è quella di utilizzare tempi di centrifugazione non inferiori ai 10 minuti (compatibili con lo stato di urgenza), e questo tempo deve essere impostato su tutte le centrifughe del laboratorio in tutte le situazioni di routine/urgenza/emergenza. Con questo tempo di centrifugazione devono essere preparati non solo i campioni dei pazienti, ma devono essere processati anche i campioni dei soggetti normali che vengono utilizzati per definire gli intervalli di riferimento dei vari esami coagulativi, come suggerisce anche il già citato documento (1).

La velocità della centrifuga deve essere accuratamente controllata specialmente nella fase di arresto (decelerazione) per evitare un brusco arresto con rimescolamento dei campioni (51). La fase di arresto deve avvenire dunque con il freno disinserito.

Per la maggior parte degli esami di coagulazione è sufficiente una sola centrifugazione condotta alla temperatura, alla velocità e per il tempo sopra indicato. Solo per alcuni esami è necessario operare una doppia centrifugazione, onde eliminare completamente la presenza di piastrine o altre microparticelle che possono alterare i risultati degli esami. Per le determinazioni di Lupus Anticoagulant (LAC), per la resistenza alla

Proteina C attivata e per la determinazione dell'attività anti-fattore X attivato è consigliata una doppia centrifugazione a 1500 g per 15 minuti con decantazione tra una centrifugazione e l'altra (1-6). Per la separazione del plasma devono essere usate pipette automatiche e non pipette di plastica che possono aspirare frammenti piastrinici. Non devono essere utilizzati i filtri nella preparazione del plasma per la determinazione di LAC, in quanto questi possono determinare alterazioni e perdita di attività funzionali di alcuni fattori della coagulazione.

Raccomandazione per la centrifugazione di campioni

La centrifugazione dei campioni deve essere eseguita:

- a temperatura ambiente (tra 15 e 25°C)
 - ad una velocità consigliata di 1 500 g
 - per un tempo non inferiore ai 10 minuti (solo per alcuni esami specialistici sono previste velocità e modalità differenti)
 - col freno disinserito
 - controllando periodicamente (ogni 6 mesi) la conta piastrinica sui campioni di plasma
-

INTERFERENZE ANALITICHE

Ittero e lipemia

Tra le variabili che possono interferire sui risultati degli esami coagulativi, la lipemia e l'ittero incidono su una percentuale di campioni che varia dallo 0,5 al 2,5% a seconda del tipo di laboratorio clinico e del numero di pazienti ricoverati rispetto ai pazienti ambulatoriali (52-54).

La lipemia si manifesta con aumento della torbidità dei campioni dovuta all'accumulo di lipoproteine, specialmente chilomicroni del diametro di 70-1000 nm, mentre le altre lipoproteine di dimensioni minori sembrerebbero meno influenti. Nella maggior parte dei casi la lipemia dipende da una inadeguata temporizzazione del prelievo rispetto al pasto (ad esempio pazienti che accedono ai dipartimenti di emergenza e accettazione), o rispetto alla somministrazione parenterale di emulsioni lipidiche (55).

Al momento non vi sono chiare evidenze bibliografiche che un aumento della concentrazione plasmatica di bilirubina provochi una significativa interferenza funzionale sugli esami coagulativi. Al contrario, dopo il consumo di un pasto ricco di grassi si è osservato aumento acuto dell'attività procoagulante del fattore VII, dovuta soprattutto all'aumento della concentrazione del fattore VII attivato (FVIIa). I pasti ad alto contenuto lipidico hanno anche un effetto transitorio sulla funzionalità piastrinica e potrebbero ridurre l'attività di alcuni fattori della coagulazione (come il FII, FIX, FX, FVII, FVIIa, FXIIa) (56).

Il documento CLSI H21-A5 (1) riferisce di un piccolo studio su campioni lipemici nel quale si è osservato un

accorciamento dei tempi di coagulazione di PT e APTT, e un aumento del fibrinogeno in proporzione variabile dal 10% al 15% (1). Per evitare l'interferenza da parte delle particelle lipidiche, il documento CLSI (1) raccomanda la rimozione dei trigliceridi in eccesso mediante ultracentrifugazione. Altri autori, data l'incompatibilità di tale metodica con la pratica routinaria dei laboratori clinici e i limiti dovuti alla possibile precipitazione delle molecole di maggiori dimensioni quali il fibrinogeno e i complessi fattore VIII-fattore von Willebrand, consigliano la microcentrifugazione ad alta velocità o l'estrazione dei lipidi con solventi organici o l'impiego di soluzioni chiarificanti. A tal proposito tuttavia non esistono studi pubblicati, per cui non si ritiene consigliabile il ricorso a queste pratiche (57).

La presenza di bilirubina e di lipemia interferisce sugli esami di coagulazione con meccanismi vari che dipendono oltre che dalla concentrazione della sostanza interferente, anche dal metodo (coagulativo, cromogenico o immunologico) e dal metodo di rilevazione del coagulo (ottico, elettromeccanico o magneto-meccanico). Ittero e lipemia interferiscono con l'assorbimento nei test immunoturbidimetrici e cromogenici, e possono impedire o ridurre la trasmissione di luce durante la lettura del coagulo utilizzando coagulometri foto-ottici.

Poiché l'iperbilirubinemia e l'iperlipemia interferiscono con le letture ottiche per sovrapposizione delle assorbanze e la lipemia interferisce sulle letture ottiche influenzando la trasmissione della luce, CLSI consiglia di utilizzare per i campioni itterici e/o lipemici preferibilmente metodi per la rilevazione del coagulo di tipo meccanico e/o elettromeccanico (1).

Tuttavia, la recente possibilità sui coagulometri di ultima generazione, di acquisire risultati degli esami coagulativi a diverse lunghezze d'onda, consente di superare i problemi legati alla sovrapposizione degli spettri di assorbimento tipici di ittero e lipemia. Pertanto, la frequenza di campioni con mancata refertazione dei risultati attribuibile ad ittero e lipemia è fortemente diminuita. Nondimeno in presenza di un campione fortemente lattescente o itterico è opportuno segnalare la possibile interferenza sui risultati ottenuti.

Per i metodi cromogenici e immunoturbidimetrici, infine, qualunque sia il metodo di rilevazione del coagulo impiegato nel coagulometro utilizzato, non possono essere escluse interferenze da ittero e lipemia e deve quindi essere sempre segnalata la possibile interferenza sui risultati ottenuti (1).

Raccomandazioni per i campioni itterici e lipemici

Metodi coagulativi

- CLSI consiglia di utilizzare per i campioni itterici e/o lipemici preferibilmente metodi per la rilevazione del coagulo di tipo meccanico e/o elettromeccanico.

- La possibilità di acquisire sui coagulometri foto-ottici di ultima generazione i risultati dei metodi coagulativi a diverse lunghezze d'onda, consente di superare i problemi legati ad ittero e lipemia.

- Per i risultati ottenuti sui coagulometri foto-ottici è opportuno segnalare la possibile interferenza da ittero o lipemia sui risultati ottenuti inserendo il seguente commento: *“campione lipemico (o itterico), esame eseguito a lunghezza d'onda dedicata, non si può tuttavia escludere una minima interferenza sul risultato.”*

Metodi immunoturbidimetrici o cromogenici

- Refertare segnalando la possibile interferenza da ittero o lipemia sui risultati ottenuti.

Emolisi

L'emolisi rappresenta la non conformità più frequente nei campioni di sangue che afferiscono ai laboratori, con una prevalenza relativa del 3,3% (57). L'emolisi può essere attribuita a cause in vivo, di tipo ereditario, acquisito o iatrogeno, come ad esempio in corso di anemia emolitica autoimmune, infezioni severe, coagulazione intravascolare disseminata o reazioni trasfusionali. In questi casi l'emolisi non deve essere attribuita alle modalità del prelievo o alle manipolazioni successive ed è quindi inevitabile (58).

Molto più frequentemente l'emolisi si verifica in vitro, ed è quindi dovuta a problemi che si possono verificare durante la raccolta del campione, la sua manipolazione o il suo trattamento. Nel caso si verifichi durante il prelievo, l'emolisi può essere dovuta a:

- difficoltà nella ricerca dell'accesso venoso o nel prelievo,
- applicazione del laccio per tempi troppo lunghi,
- presenza di vene sottili o fragili,
- utilizzo di aghi troppo sottili (>23 G),
- agitazione troppo vigorosa della provetta,
- esposizione a temperature eccessivamente basse o elevate (<15 o >30°C).

L'esecuzione degli esami di valutazione dell'emostasi prevede l'utilizzo di reagenti diversi per composizione e origine, di metodologie diverse (coagulative, cromogeniche e immunologiche) e, soprattutto, di strumentazioni basate su principi differenti. In particolare, gli strumenti a rilevazione elettromeccanica o magneto-meccanica sono insensibili alle diverse colorazioni prodotte dall'emolisi. Sui coagulometri foto-ottici di ultima generazione sono state recentemente implementate nuove lunghezze d'onda per la lettura della formazione del coagulo, e questo consente di superare le possibili interferenze spettrofotometriche dovute non solo alla presenza dell'emolisi ma anche a quelle attribuibili all'ittero e alla iperlipemia.

Moltissimi studi sono stati eseguiti per stabilire se e in quale misura gli esami dell'emostasi siano inficiati dalla presenza di emolisi. Diversi tipi di approcci sono stati utilizzati per riprodurre l'emolisi in vitro, pochi studi hanno messo a confronto campioni dello stesso paziente con e senza segni di emolisi. Dalla maggior parte degli studi pubblicati si evidenzia che l'emolisi può alterare alcuni esami, sia a causa del rilascio di sostanze di tipo tromboplastinico sia per l'interferenza spettrofotometrica prodotta dalla emoglobina nei coagulometri di tipo foto-

ottico (2). La lisi delle membrane dei globuli rossi induce il rilascio del loro contenuto (enzimi intracellulari, ADP) nel plasma e può portare all'attivazione della coagulazione, con formazione di fattori attivati e di complessi fattori attivatori/inibitori fisiologici della coagulazione, e alla attivazione di altre linee cellulari ematiche (leucociti e piastrine).

Il GdS SIBioC ha portato a termine uno studio sulla incidenza dell'emolisi sui cinque esami principali dell'emostasi (PT, APTT, fibrinogeno, antitrombina e D-Dimero) (59). Lo studio è stato eseguito utilizzando oltre 250 coppie di campioni emolizzati prelevati presso 15 diversi laboratori. I campioni, inizialmente emolizzati, sono stati poi nuovamente prelevati entro 4 ore dal precedente prelievo e se risultavano non più emolizzati venivano processati e poi aliquotati e congelati insieme alle aliquote dei campioni emolizzati. Le analisi dei campioni (emolizzati e non) sono state poi eseguite presso un unico centro e i risultati sono stati elaborati statisticamente. Per lo studio è stato utilizzato un coagulometro foto-ottico dotato di modulo per la lettura degli interferenti (HIL). I reagenti utilizzati sono stati di una unica ditta. I risultati del lavoro collaborativo multicentrico hanno evidenziato che il PT è scarsamente influenzato dall'emolisi in vitro. Al contrario, un impatto sfavorevole più importante dell'emolisi è stato riscontrato sugli altri esami di coagulazione di routine (vale a dire APTT, D-dimero, antitrombina e fibrinogeno), il che suggerisce che questi risultati dovrebbero essere soppressi nei campioni di plasma che presentano significative tracce di emolisi. Le variazioni riscontrate per questi esami sono state sia in termini di allungamento che di accorciamento dei tempi di coagulazione (APTT), come pure si sono registrati incrementi e diminuzioni per le concentrazioni degli altri analiti (fibrinogeno, antitrombina, D-dimero), pur con una prevalenza di accorciamento degli APTT e un incremento dei valori del D-dimero.

Raccomandazioni per i campioni emolizzati

- Accertarsi che non vi siano possibili cause di emolisi in vivo.
- È possibile refertare solo il PT, segnalando comunque la presenza di emolisi; non è possibile refertare l'APTT, il fibrinogeno, il D-dimero e l'antitrombina soprattutto se i campioni sono significativamente emolizzati (Hb libera nel plasma >0,2 - 0,4 g/L a seconda dei pazienti).

SCONGELAMENTO

I campioni che non possono essere processati nei tempi consentiti (vedi sopra) e quindi sono stati congelati a temperature tra -20 e -70°C, prima di essere testati, devono essere scongelati velocemente a 37°C utilizzando un bagno termostato a temperatura controllata, per al massimo 5 minuti. Non è consentito scongelare utilizzando altre modalità, quali attendere alcuni minuti a temperatura ambiente o utilizzare il forno a microonde. L'integrità del campione viene compromessa nel caso in cui non si raggiunga il

completo scongelamento, o se si lascia per troppo tempo il campione incubato a 37°C. Dopo lo scongelamento il campione deve essere gentilmente omogenato e miscelato al fine di risospingere gli eventuali precipitati formati durante il congelamento (4,60). L'uso di vortex o basculanti causa una differenza statisticamente significativa sulla concentrazione del fibrinogeno e del fattore VIII (61).

I campioni conservati in ghiaccio secco devono invece essere scongelati, una volta stappati, in un incubatore a 37°C per almeno 15 minuti onde consentire l'evaporazione della CO₂ contenuta nel plasma. Se la CO₂ non viene eliminata dal plasma, essa può indurre falsi allungamenti dei tempi di coagulazione a causa del pH alterato.

I campioni per gli esami di coagulazione possono essere sottoposti ad un solo ciclo di congelamento/scongelamento senza che i risultati risultino inficiati. È stato osservato che multipli cicli di congelamento/scongelamento possono influenzare considerevolmente i valori degli esami. Il fattore V e il VIII, come la Proteina S, perdono di attività nel caso di scongelamenti e congelamenti ripetuti. Per questo motivo si consiglia il ricongelamento dei plasmi sui quali devono essere eseguiti esami di coagulazione, in particolare per gli esami dedicati alla misurazione delle attività procoagulanti (determinazione dei fattori) e delle attività inibitorie (determinazione degli inibitori fisiologici) (4,6,60).

Raccomandazioni per il congelamento e lo scongelamento

Qualora le determinazioni non possano essere eseguite entro i tempi precedentemente suggeriti per vari motivi (organizzazione interna, ottimizzazione delle risorse, prelievo presso sedi lontane), devono essere preparate delle aliquote di plasma ottenute secondo le procedure di centrifugazione prima elencate.

- Per il congelamento devono essere utilizzate provette di polipropilene con chiusura a pressione o con tappo a vite; la quantità di plasma non deve mai eccedere 1 mL per provetta. La procedura di congelamento deve avvenire in maniera rapida: il metodo di riferimento è l'utilizzo di azoto liquido, in alternativa può essere utilizzato un congelatore a -70/-80°C.

- L'utilizzo del congelatore a -20°C è permesso solo per conservare le aliquote dopo averle congelate rapidamente; in questo caso la stabilità dei campioni è molto inferiore a quella che si può ottenere con un congelatore a -70° (vedi Tabella 4).

- Per il trasporto delle aliquote congelate è possibile utilizzare ghiaccio secco o altri sistemi che permettano di mantenere il campione correttamente congelato. L'utilizzo del ghiaccio secco induce, però, una acidificazione del plasma per diffusione della CO₂ nel campione con formazione di acido carbonico e conseguente abbassamento del pH che si riflette in un allungamento dei tempi di PT e APTT e una diminuzione dei valori di fibrinogeno e proteina C. Questi effetti indesiderati possono essere evitati se il campione trasportato in ghiaccio secco viene successivamente conservato a -80°C per almeno 24 ore o se, in fase di scongelamento, si lascia la provetta senza tappo per almeno 15 minuti a 37°C. La conservazione del campione a -20°C non permette la neutralizzazione dell'acidificazione ed è quindi, in questi casi, sconsigliata.

- Prima del loro utilizzo i campioni devono essere scongelati velocemente a 37°C utilizzando un bagno termostato a temperatura controllata per un tempo massimo di 5 minuti; non è permesso effettuare lo scongelamento utilizzando altre modalità, quali attendere qualche minuto a temperatura ambiente o utilizzare il forno a microonde. L'integrità del campione viene compromessa nel caso in cui non si raggiunga il completo scongelamento o se viene lasciato per troppo tempo incubato a 37°C.

- Dopo lo scongelamento il campione deve essere omogenato e miscelato al fine di risospingere gli eventuali precipitati formati durante il congelamento.

- I campioni possono essere sottoposti ad un unico ciclo di congelamento/scongelamento senza perdere di attendibilità; multipli cicli di congelamento/scongelamento influenzano notevolmente i livelli di attività di fattori procoagulanti e di inibitori fisiologici.

CONCLUSIONI

Il monitoraggio e la gestione continua degli errori preanalitici sono cruciali per migliorare la qualità della fase preanalitica. Gli sforzi di standardizzazione sono essenziali per controllare e prevenire gli errori e per garantire la qualità degli esami dell'emostasi. A causa dello sviluppo di grandi reti di laboratori, e di un crescente numero di centri prelievi periferici, è necessario introdurre procedure rigorose per tutte le fasi che precedono l'esecuzione di queste indagini, incluse la preparazione del paziente, il prelievo, la manipolazione, la conservazione e il trasporto dei campioni. Queste Raccomandazioni hanno lo scopo di individuare tempestivamente problemi nella fase preanalitica che possono impedire di ottenere risultati accurati e affidabili.

Gli effetti delle variabili preanalitiche sull'affidabilità e sulla coerenza degli esami di coagulazione sono talora ignorati e sottovalutati anche da parte degli operatori del settore. Questo aspetto può e deve essere migliorato, educando i professionisti sanitari che sono coinvolti in tutte le fasi operative, dalla esecuzione del prelievo fino alla firma dei referti.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano sentitamente i componenti del Gruppo Emostasi Piemonte e Valle d'Aosta (GEPAL) e del Gruppo Emostasi e Trombosi Unificato Piemonte e Valle d'Aosta (GETUP) che hanno partecipato alla stesura del documento e il Gruppo di Studio SIBioC Variabilità extra-analitica per l'attenta revisione del documento stesso.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and

- molecular hemostasis assays; approved guideline. 5th ed. CLSI Document H21-A5. CLSI: Wayne, PA, 2008.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Collection of Diagnostic Venous Blood Specimens; CLSI standard GP-41. 7th ed. CLSI: Wayne, PA, 2017.
 3. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:565-75.
 4. Adcock Funk DM, Lippi GL, et al. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:576-85.
 5. Ingram GI, Hills M. The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. *Thromb Haemost* 1976;36:230-6.
 6. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, et al. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J* 2016 doi: 10.1186/s12959-016-0123-z
 7. Favalaro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012;43:1-10.
 8. Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, et al. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77:153-63.
 9. Cornes M, van Dongen-Lases E, Grankvist K, et al. Order of blood draw: Opinion Paper by the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med* 2017;55:27-31.
 10. Simundic AM, Bolenius K, Cadamuro J et al. Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:2015-38.
 11. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17:557-61.
 12. Lima-Oliveira G, Guidi GC, Salvagno GL, et al. Is phlebotomy part of the dark side in the clinical laboratory struggle for quality? *Lab Med* 2012;43:172-6.
 13. Lippi G, Lima-Oliveira G, Guidi GC. Does fist pumping/clenching during venipuncture activate blood coagulation? *Blood Coagul Fibrinolysis* 2016;27:357-60
 14. Rajmakers MT, Menting CH, Vader HL, et al. Collection of blood specimens by venipuncture for plasma-based coagulation assays: necessity of a discard tube. *Am J Clin Pathol* 2010;133:331-5.
 15. Chantarangkul V, Tripodi A, Clerici M, et al. 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.
 16. Adcock DM, David C, Kressin DC, et al. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing dependence on citrate concentration. *Am J Clin Pathol* 1998;109:595-9.
 17. van den Besselaar AM, van Vloderp IJ, Berendes PB, et al. A comparative study of conventional versus new, magnesium-poor Vacutainer® sodium citrate blood collection tubes for determination of prothrombin time and INR. *Thromb Res* 2014;134:187-91.
 18. Adcock DM, Funk D. Sample integrity and preanalytical variables. In: Kitchen S, Olson JD, Preston FE eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis* 2013: 45-55.
 19. Reneke J, Etzell 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;109:754-7.
 20. Lippi G, Salvagno G, Montagnana M, et al. The bias of routine hemostasis testing due to underfilling of primary blood tubes is not mathematically predictable. Annual Meeting of the American Association of Clinical Chemistry (AACC), Los Angeles July 2012. *Clin Chem* 2012; (Suppl): A47.
 21. Pretorius L, van Rensburg J, Conradie C, et al. Minimum citrate tube fill volume for routine coagulation testing. *Int J Lab Hem* 2014;36:493-5.
 22. Chuang J, Sadler MA, Witt DM. Impact of evacuated collection tube fill volume and mixing on routine coagulation testing using 2.5-mL (pediatric) tubes. *Chest* 2004;126:1262-6.
 23. Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values *Am J Clin Pathol* 2006;126:400-5.
 24. Siegel JE, SwamiVK, Glenn P et al. Effect (or lack of it) of severe anemia on PT and aPTT results. *Am J Clin Pathol* 1998;110:106-10.
 25. Leblanc RM. Le pré-analytique en hémostasie et les recommandations du Groupe d'études sur l'hémostasie et la thrombose (GEHT). ScienceDirect, [https://doi.org/10.1016/S0992-5945\(09\)70113-8](https://doi.org/10.1016/S0992-5945(09)70113-8). (ultimo accesso: Febbraio 2019).
 26. Favalaro EJ, Adcock DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012;43:1-10.
 27. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, et al. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Hemost* 2008; 99:416-26.
 28. Bohm M, Teaschner S, Kretschamr E, et al. Cold storage of citrated whole blood induces drastic time-dependent losses of factor VIII and von Willebrand factor: potential misdiagnosis of haemophilia and von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;17:1589-90.
 29. Plebani M, Zaninotto M. Pneumatic tube delivery systems for patient samples: evidence quality and quality of evidence. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1245-6.
 30. Dyskiewicz-Korpanty A, Quniton R, Jassine J, et al. The effect of pneumatic tube transport on PFA100 closure time and whole blood aggregation. *J Thromb Haemost* 2004; 2:354-6.
 31. Birri N, Baumgartner D, Conte T, et al. Stability of low molecular heparin and factor X activity in citrated whole blood and plasma. *Br J Haematol* 2011;155:629-31.
 32. Froom P, Barak M. Lupus Anticoagulant testing: analyzing fresh samples after a single centrifugation and after 6-8 hr delay. *Clin Chem Lab Med* 2012;50:367-70.
 33. Woodhams B, Girardot O, Blanco M, et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12:229-36.
 34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Laboratory testing for the lupus anticoagulants; approved guideline, 1st ed.* CLSI Document H60-A. CLSI: Wayne, PA, 2014.
 35. Rimac V, Coen-Herak D. Is it acceptable to use coagulation plasma samples stored at room temperature and 4°C for 24 hours for additional prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, antithrombin, and D-dimer testing? *Int J Lab Hematol* 2017;39:547-81.
 36. Zhao Y, Guofang F Zhang J, et al. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci Rep* 2017;7:12179.

37. Toulon P, Metge S, Hangard M, et al. Impact of different storage times at room temperature of unspun citrated blood samples on routine coagulation tests results. Results of a bicenter study and review of the literature. *Int J Lab Hem* 2017;39:458-68.
38. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, et al. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009; 31:462-7.
39. Feng L, Zhai Y, Zhai H, et al. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014;4:3868.
40. Kemkes-Matthes B, Fischer R, Peetz D. Influence of 8 and 24-h storage of whole blood at ambient temperature on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, thrombin time, antithrombin and D-dimer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011;22:215-20.
41. McGrail R, Revsholm J, Nissen PH, et al. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. *Thromb Res* 2016; 148:108-10.
42. GFHT. (French Study Group on Hemostasis and Thrombosis). 2015. http://site.geht.org/site/Pratiques-Professionnelles/Documents-GEHT/Variables-Preanalytiques/Recommandations-Variabes-preanalytiques_69_722.html
43. Adcock DM, Favaloro EJ, Lippi G. Critical pre-examination variables in the hemostasis laboratory and their quality indicators. *Clin Biochem* 2016;49:1315-20.
44. Suchsland J, Friedrich N, Grotevendt A, et al. A. Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52:1187-91.
45. Pappas AA, Palmer SK, Meece D, et al. Rapid preparation of plasma for coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:816-7.
46. Nelson S, Pritt A, Marlar RA. Rapid preparation of plasma for STAT coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118:175-6.
47. Boudaoud L, Divaret G, Marie P, et al. Rapid centrifugation for routine coagulation testing. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2006;64:315-7.
48. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18:525-8.
49. Sultan A. Five-minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing. *East Mediterr Health J* 2010;16:233-6.
50. Boissier E, Sévin-Allouet M, Le Thuaut A, et al. A 2-min at 4500 g rather than a 15-min at 2200 g centrifugation does not impact the reliability of 10 critical coagulation assays. *Clin Chem Lab Med* 2017;55: e118-e121.
51. Daves M, Giacomuzzi K, Tagnin E, et al. Influence of centrifuge brake on residual platelet count and routine coagulation tests in citrated plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25:292-5.
52. Salvagno GL, Lippi G, Bassi A, et al. Prevalence and type of preanalytical problems for inpatients samples in coagulation laboratory. *J Eval Clin Pract* 2008;14:351-3.
53. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, et al. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem* 1989;35:837-9.
54. Goswami B, Singh B, Chawda R, et al. Evaluation of errors in a Clinical Laboratory: a one-year experience. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:63-6.
55. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med* 2014;24:57-67.
56. Lippi G, Plebani M, Favaloro E. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Sem Thromb Haemost* 2013;39:258-66.
57. Smith MB, Chan YW, Dolci A et al. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Hemolysis, Icterus and Lipemia/turbidimetry. Indices and indicators of Interferences in Clinical laboratory Analysis: Approved Guideline. CLSI Document C56-A. Wayne USA:2012.
58. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolized specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem* 2000;46:306-7.
59. Novelli C, Vidali M, Brando B, et al. A collaborative study by the Working Group on Hemostasis and Thrombosis of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) on the interference of haemolysis on five routine blood coagulation tests by evaluation of 269 paired haemolysed/non-haemolysed samples. *Biochem Med (Zagreb)* 2018. doi: 10.11613/BM.2018.030711.
60. Gosselin RC, Honeychurch K, Kang HJ, et al. Effects of storage and thawing conditions on coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2015;37:551-9.
61. Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, et al. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clin Biochem* 2016; 49:1399-401.