Il tempo di protrombina: review

F. Manzato

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "Carlo Poma", Mantova

Riassunto

Il Tempo di protrombina (PT) introdotto da Quick circa 75 anni fa, rimane il test più utilizzato per il monitoraggio della terapia anticoagulante. Quick descrisse il metodo per dosare la "protrombina", misurando il tempo di formazione del coagulo di un plasma citratato dopo ricalcificazione in presenza di tromboplastina. A quel tempo erano in molti a pensare che il PT non fosse di alcuna utilità e che fosse sbagliato dal punto di vista teorico. Oggi è risaputo che la "protrombina" misurata dal test di Quick è in realtà un complesso di fattori di cui tre sono vitamina K dipendenti. Con l'introduzione della terapia anticoagulante il PT è stato adottato come il test di scelta per stabilire il dosaggio del farmaco. Tuttavia le varie tromboplastine hanno sensibilità diverse ai difetti indotti dagli antagonisti della vitamina K. I Laboratori utilizzavano tecniche, reagenti, metodi di refertazione ed intervalli terapeutici molto diversi tra di loro. La standardizzazione del PT incomincia nel 1962 con la produzione ed la fornitura a tutti i laboratori che ne avessero fatto richiesta di una tromboplastina umana standardizzata, la cosiddetta *Manchester comparative reagent*. Nel 1983, per rispondere alla necessità di standardizzazione a livello mondiale, la *World Health Organization* (WHO) ha stabilito uno schema basato *sull'International Sensitivity Index* (ISI) delle tromboplastine per fornire *l'International Normalized Ratios* (INR). Anche se l'ISI è in grado di correggere la maggiori differenze nei risultati dei PT, si osservano ancora discrepanze negli INR ottenuti con combinazioni reagente/coagulometro diverse. Appare pertanto essenziale la calibrazione locale dell'ISI. Inoltre, l'INR non è standardizzato per i PT dei pazienti epatopatici. Dopo 70 anni dalla sua introduzione è tempo di provvedere a questa standardizzazione con l'introduzione di un nuovo INR, il INR_{Liver}.

Summary

The Prothrombin time: review

Quick's prothrombin time (PT) test, originally introduced in 1935, remains the most universally popular method for monitoring anticoagulant therapy. Quick set out to device a means of assaying "prothrombin" by measuring the recalcification time of citrated plasma in presence of thromboplastin reagent. At that time many clinicians refused to see any practical value in the PT test and even doubted its validity on theoretical ground. Today it is known that the "prothrombin" measured by Quick's test is a complex of factors and, among them, 3 are vitamin K dependent. With the introduction of oral anticoagulant therapy the PT was adopted as the test of choice for dosage prescription. However, thromboplastins can vary markedly in their responsiveness to the defects induced by vitamin K antagonist therapy. There were wide variation in laboratory techniques and reagents, methods of reporting results and therapeutic ranges advocated. Standardization of the PT had begun in 1962 with the supply of a standardized human thromboplastin to clinical laboratories, the so called Manchester comparative reagent. In 1983, owing to the need for worldwide standardization, the World Health Organization (WHO) established a scheme based on the International Sensitivity Index (ISI) of thromboplastin reagent to provide International Normalized Ratios (INR). Although the ISI corrects for major differences in PT results between test systems (thromboplstin/coagulometer combinations), persistent INR disagreement between results with different test systems is frequently observed. Local PT system ISI calibration, therefore, appears essential. Moreover, the use of INR for reporting PT in patients with liver disease fails to yield standardization. After more than 70 years since its introduction it is now time to think about its standardization for patients with liver diseases with the introduction of a new INR, the INR_{Liver}.

Key-words: Prothrombin Time, Anticoagulants/therapeutic use, Blood Coagulation Disorders/diagnosis, Drug Monitoring, International Normalized Ratio.

Ricevuto: 30-03-2009 Pubblicato on-line: 04-05-2009

Corrispondenza a: Dott. Franco Manzato, Laboratorio Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "Carlo Poma", Viale Albertoni n.1, 46100 Mantova. Tel. 0376-201374, fax 0376-201658, e-mail: franco.manzato@ospedalimantova.it

Nonostante le crescenti aspettative su nuovi anticoagulanti, come gli inibitori diretti della trombina, gli antagonisti della vitamina K, come la warfarina, sono a tutto oggi gli anticoagulanti più utilizzati in clinica. Di conseguenza il Tempo di Protrombina (PT), conosciuto anche come tempo di Quick, è di gran lunga il test più richiesto della coagulazione. Il PT è concettualmente semplice; rappresenta il tempo di formazione del coagulo dopo ricalcificazione del plasma, accelerato dall'aggiunta di un potente estratto tessutale: la tromboplastina. Dobbiamo la sua descrizione, circa 75 anni fa, ad Armand J. Quick[1], pioniere e profeta delle ricerche nel campo della coagulazione. Quick era convinto che il suo test saggiasse l'attività della protrombina, donde il nome. Oggi è risaputo che il PT è influenzato, oltre che dal fattore V e dal fibrinogeno, dalla maggior parte dei fattori K dipendenti (VII, X e II). Per questo è il test che meglio correla con l'effetto anticoagulante dei dicumarolici ed è il test di scelta per il monitoraggio della terapia anticoagulante. A quel tempo la teoria della coagulazione era dominata da un modello molto semplice proposto da Paul Morawitz[2] secondo il quale l'arresto spontaneo dell'emorragia era dovuto ad una serie di reazioni chimiche che avvenivano nel plasma. Era noto che la trombina, la proteina in grado di trasformare il fibrinogeno in fibrina, non circolava in forma attiva ma come suo precursore, la protrombina che, al momento del danno, era trasformata in trombina da un fattore tessutale chiamato tromboplastina o trombokinasi. Si sapeva anche che il citrato e l'ossalato, rimuovendo il calcio, impedivano la trasformazione della protrombina in trombina, prevenendo la formazione del coagulo. L'idea di Quick era che, aggiungendo quantità costanti di calcio e tromboplastina a del plasma ossalato, se la concentrazione del fibrinogeno era adeguata, il tempo di formazione del coagulo sarebbe dipeso da un'unica variabile: la concentrazione della protrombina. La difficoltà maggiore consisteva nel trovare e standardizzare un reagente tromboplastinico che potesse sostituire in vitro l'elusiva sostanza naturale; un estratto di cervello di coniglio, in una prima formulazione seccato all'aria e, in una riformulazione di qualche anno dopo, deidratato con acetone, si dimostrò adatto allo scopo. La messa a punto della tecnica aveva portato il tempo del "normale" a 12 secondi. Fin dalle prime osservazioni fu chiaro che il PT era normale nell'emofilia mentre risultava allungato nei pazienti con ittero ostruttivo[3]. In molti dubitavano di un possibile utilizzo pratico del test ma due scoperte avrebbero smentito i detrattori. Henrik Dam osservò che pulcini alimentati con una dieta "priva di colesterolo" morivano di emorragia, che qualcos'altro era estratto dalla loro dieta e che il difetto era corretto dalla somministrazione di questa nuova sostanza chiamata "Koagulation-Vitamin"; la vitamina K[4]. Quick dimostrò nel 1937 che i pulcini che sanguinavano avevano un deficit di protrombina[5]. Da anni era noto che il bestiame alimentato con trifoglio fermentato contraeva una disastrosa malattia emorragica caratterizzata da allungamento del PT. Nel 1941 Campbell e Link isolarono la sostanza responsabile dell'emorragia, il *bishidroxycoumarin*, ne dimostrarono l'effetto anti vitamina K e ne provarono l'efficacia come anticoagulante[6,7]. Lo stesso gruppo di ricercatori scoprì un anticoagulante più potente, solubile in acqua, con un'emivita più breve e quindi più maneggevole, chiamato *warf*arin in onore di *Wisconsin Alumni Research Foundation*[8]. Utilizzati all'inizio come veleno per topi, a partire dagli anni 50, i dicumarolici cominciarono ad essere ampiamente impiegati nelle malattie tromboemboliche. *Trials* clinici iniziarono subito dopo ed il PT si dimostrò essenziale per il loro monitoraggio. Basandosi sulla tromboplastina ottenuta da cervello umano, l'*American Heart Association* (AHA) raccomandò un prolungamento del PT di 2,0-2,5 volte[9]. Tuttavia la tromboplastina umana, preparata nei singoli laboratori, tutti i giorni, utilizzando cervelli da cadavere, fu ben presto rimpiazzata dalle preparazioni commerciali, non appena queste si resero disponibili, per l'ovvia comodità ma anche per una presunta standardizzazione. In realtà, invece di migliorare la sicurezza della terapia anticoagulante, si ottenne l'effetto contrario. La notevole differenza in sensibilità delle varie tromboplastine al difetto indotto dai dicumarolici, può influenzare significativamente il dosaggio e, di conseguenza, l'intensità della coagulazione. Una valutazione internazionale condotta nel 1975 sulla terapia anticoagulante e sul suo controllo, dimostrò l'ampia variabilità dei metodi di laboratorio, dei reagenti, del modo di riportare i risultati e, soprattutto, degli intervalli terapeutici adottati[10]; il limite superiore del *range* terapeutico adottato in alcuni paesi era più basso del limite inferiore di altri. La dose media giornaliera di warfarina per ottenere lo stesso *range* terapeutico variava fino a quattro volte dai paesi del Nord America, dove si utilizzavano tromboplastine commerciali poco sensibili, al Regno Unito, dove ancora si utilizzava la tromboplastina umana[11]. In un altro studio condotto su pazienti con trombosi venosa prossimale, i pazienti randomizzati ad un prolungamento del PT 2,0–2,5 volte il normale ottenuto con tromboplastina umana, a parità di protezione dalle ricorrenze, assumevano molto meno anticoagulante e manifestavano un quinto delle complicanze emorragiche rispetto al gruppo assegnato ad un *range* 1,5-2,0 volte il normale ottenuto con una tipica tromboplastina di coniglio[12]. Se l'utilizzo di differenti tromboplastine era la causa maggiore nel determinare l'enorme variazione in sensibilità all'effetto degli anticoagulanti, un'ulteriore complicazione era data dall'interpretazione e dai numerosi modi con cui si riportavano i risultati del PT.

- *Tempo di protrombina* espresso in secondi
- *Attività protrombinica*: da una curva di calibrazione costruita utilizzando diluizioni seriali di un pool di plasmi normali, si convertono i secondi in attività percentuale.
- *Indice di protrombina (index)*: è il rapporto tra il tempo

in secondi del "normale" ed il tempo del paziente x 100.

- *Rapporto di protrombina (ratio)*: è il rapporto tra il tempo in secondi del paziente ed il tempo del "normale". Raccomandato da Biggs[13], si era dimostrato efficace nel ridurre l'effetto di variazioni interlaboratorio, anche se non risolveva il problema della standardizzazione.

La Gran Bretagna è stato il primo paese a standardizzare il controllo della terapia anticoagulante su scala nazionale ed a fornire uno schema che si è dimostrato realizzabile ed efficace. Nei primi anni 60 la tromboplastina preparata da cervello umano all'*Withington Hospital* di *Manchester,* conosciuta come la *Manchester Comparative Reagent* (MCR) era fornita a tutti gli ospedali che ne avessero fatto richiesta per il dosaggio routinario del PT. Nel giro di pochi anni il MCR si diffuse a più della metà della Britannia. A metà degli anni 60 un altro importante passo per la standardizzazione; Biggs e Denson dimostrarono che i PT espressi in *ratio* ottenuti con tromboplastine differenti, correlavano tra di loro[13]. Nel 1969 un lotto di MCR era identificato come tromboplastina nazionale di riferimento, la *British Comparative Thromboplastin* (BCT) ed il *British Corrected Ratio* (BCR) era identificato come il sistema nazionale di riportare i risultati del PT. Il riconoscimento ufficiale avvenne nel 1970, in seguito alle raccomandazioni del *British Committee for Standards in Haematology*[14]. La BCT si sarebbe dovuta utilizzare esclusivamente come tromboplastina di riferimento per calibrare le altre tromboplastine da impiegare routinariamente; i risultati ottenuti con la tromboplastina locale potevano essere trasformati nell'*equivalent ratio* della BCT: il BCR. Lo schema, pur avendo riscosso un grande successo, aveva un limite intrinseco; a metà degli anni 70 la quasi totalità dei laboratori del Regno Unito utilizzava la tromboplastina di riferimento per la determinazione routinaria del PT. La necessità di standardizzare la misura del PT *ratio* in tutto il mondo indusse nel 1977 l'*Expert Committee on Biological Standardization* (ECBS) del WHO a designare un lotto liofilizzato di tromboplastina umana, la 67/40, come *International Reference Preparation* (IRP)[15]. Era una tromboplastina *combined*, cioè contenente plasma bovino adsorbito come fonte di fattore V e fibrinogeno (in contrasto con le *plain*, costituite dal solo estratto tessutale), ricavata da cervello umano. L'intento era di utilizzare questa tromboplastina per calibrare tutte le altre pur da specie diverse (bovina e da coniglio)[16], seguendo il metodo di calibrazione proposto da Biggs e Denson[13] e da un gruppo di esperti dell'*International Committee on Thrombosis and Haemostasis* e dell'*International Committee for Standardization in Haematology*[17]. Brevemente, come ha descritto Thomson[18], ogni nuovo lotto di tromboplastina commerciale o prodotta localmente dovrebbe essere calibrata eseguendo in parallelo il PT sul plasma fresco di almeno 12 pazienti in terapia anticoagulante e su quello di 5 controlli normali con le due tromboplastine; i risultati, trasformati in ratio, dovrebbero essere riportati su un piano cartesiano, e la migliore linea dritta (*the best straight line*) tracciata ad occhio (*by eye*) attraverso i punti. Lo *slope* della retta era chiamata *International Calibration Constant* (ICC), che per la tromboplastina 67/40 era, per definizione, pari ad 1, ed il *ratio* ottenuto con la tromboplastina locale era trasformato nell'*International Calibrated Ratio* (ICR), quello che si sarebbe ottenuto se si fosse utilizzata la IRP. Questo sistema dimostrava tuttavia alcuni limiti: la linea tratteggiata ad occhio era soggettiva o non teneva conto degli *outliers* ed il più oggettivo calcolo della regressione lineare risultava in due rette a seconda che i valori ottenuti con la IRP fossero riportati sull'asse orizzontale o verticale. Inoltre, proprio con le tromboplastine meno sensibili, la relazione tra i due insiemi di *ratio* (normali e scoagulati) non era lineare ma curva. Fondamentali le modifiche proposte da Kirkwood[19] al metodo di calibrazione del WHO: di riportare i PT espressi in secondi su scala logaritmica al posto del *ratio*, di calcolare la regressione ortogonale al posto della lineare, di riportare i PT della IRF sull'asse verticale. Lo *slope* della retta di regressione rappresentava la sensibilità della tromboplastina in esame rispetto alla IRP e era definita *International Sensitivity Index* (ISI). Mediante l'uso di tale coefficiente era possibile normalizzare i *ratio* ottenuti con qualsivoglia tromboplastina in termini standardizzati. Lo schema era approvato dal WHO che pubblicava anche le linee guida per la sua applicazione[20]: era nato l'*International Normalized Ratio* (INR). INR = (PT del paziente/MNPT)^{ISI} dove il *Mean Normal Prothrombin Time* (MNPT) è la media geometrica del tempo di protrombina di almeno 20 soggetti adulti normali di entrambi i sessi determinati con lo stesso sistema e le stesse condizioni con cui si misura il PT del paziente. Le tromboplastine sono pertanto caratterizzate dal loro *ISI*. Questo si ricava dalla comparazione dei logaritmi dei secondi del PT, ottenuti con la tromboplastina da calibrare, di 20 soggetti normali e di 60 pazienti (in trattamento anticoagulante da più di 6 settimane), con i logaritmi dei PT degli stessi plasmi ottenuti con la IRP. I risultati dell'IRP devono essere riportati sull'asse verticale, quelli della tromboplastina da calibrare sull'asse orizzontale; INR > 4,5 e < 1,5 devono essere esclusi. I campioni di sangue devono essere raccolti in citrato trisodico 109 mmol/L (9 volumi di sangue e 1 di anticoagulante) e i plasmi processati entro 5 ore dalla raccolta. A causa della quantità limitata e della possibile instabilità, la IRP 67/40, era rimpiazzata nel 1984 dalla seconda *WHO Primary IRP*, la tromboplastina umana "*plain*" (BCT/253) con un valore di ISI di 1,1[21,22]. Poiché la calibrazione di una tromboplastina è più precisa se eseguita contro una IRP di simile composizione e della stessa specie[23-25], è stato costruito un sistema di IRP nel quale tromboplastine di diversa origine animale (BCT/099, umana *plain*; BCT/441, umana, *plain*; RBT/79, coniglio, *plain*; OBT/79, bovina, *combined*) erano correlate con il primo *WHO Primary IRP,* stabilendo così una gerarchia tra le diver-

se IRP. La responsabilità della calibrazione delle tromboplastine commerciali dovrebbe essere, secondo WHO, a carico degli Organismi Nazionali e dove, come nel nostro paese, non esista questo tipo di organizzazione, si raccomanda alle ditte produttrici di fornire direttamente il valore dell'ISI con una calibrazione *like versus like* contro la IRP della stessa specie. In Italia il Comitato Italiano per la Standardizzazione dei Metodi Ematologici e di Laboratorio (CISMEL) offre alle ditte produttrici la propria esperienza per certificare le tromboplastine commercializzate nel nostro paese. Contemporaneamente si raccomanda ai Laboratori ed ai Clinici di adottare l'INR per il dosaggio degli anticoagulanti. Nel 1992 si era resa disponibile la prima tromboplastina umana ricombinante[26]. Quando le scorte della BCT/253 si esaurirono, una nuova preparazione di tromboplastina umana ricombinante (la rTF/95) divenne, nel 1996, il terzo *International Standard for Thomboplastin*, con un valore di ISI di 0,94[27,28]. Attualmente ci sono due IRP fornite da WHO ed una dall'*European Union* che garantiscono un approvvigionamento costante per gli Organismi Nazionali e per i produttori di tromboplastina. Tripodi[29] e le nuove Linee Guida del WHO riviste nel 1999[30] raccomandano che la calibrazione delle nuove IRP debba essere condotta da uno studio internazionale multicentrico, utilizzando plasmi freschi di pazienti in terapia anticoagulante e di normali, con la tecnica manuale per l'esecuzione del PT, verso tutte le IRP disponibili e che l'ISI assegnato dovrà essere la media degli ISI ottenuti dalle singole calibrazioni. Nelle stesse Linee Guida si raccomanda che la calibrazione di standard secondari (es. le preparazioni di riferimento nazionali e gli standard di lavoro dei produttori) debba essere condotta da almeno due laboratori contro la IRP della stessa specie con la logica del *like versus like*. La calibrazione delle preparazione commerciali contro il corrispondente standard di lavoro da parte dei produttori (la calibrazione *lot-to-lot*) deve essere condotta contro uno standard di lavoro dalle caratteristiche simili: derivato dallo stesso tessuto, della stessa specie, utilizzando un processo di produzione simile. Il metodo manuale consiste nel dispensare 0,1 mL di plasma sul fondo di una provetta di vetro (75 per 100 mm), posta in bagno termostatato a 37°C, e aggiungervi, dopo un minuto, 0,2 mL di tromboplastina calcica preriscaldata a 37°C, facendo scattare contemporaneamente il cronometro. Si inclina continuamente e delicatamente la provetta (3 volte ogni 5 secondi con un angolo di 90°) fino alla comparsa del coagulo di fibrina[31]. L'aumento dei carichi di lavoro ha reso necessaria la sostituzione dell'originale tecnica manuale con l'automazione su coagulometri. Ci sono tuttavia evidenze sostanziali che i coagulometri hanno un'imprevedibile e spiccato effetto sull'ISI delle tromboplastine[32-35]. Per ovviare a questo inconveniente, alcuni produttori forniscono l'ISI per una particolare combinazione tromboplastina/coagulometro, il così detto *instrument specific ISI's*. Anche questa procedura ha dei limiti per le molte possibili combinazioni tromboplastina/coagulometro e perché l'ISI spesso differisce con la stessa tromboplastina perfino con strumenti dello stesso tipo[36,37]. E' pertanto essenziale calibrare l'ISI del *local PT system* (cioè la singola combinazione tromboplastina/coagulometro) quando il controllo di qualità dell'INR con plasmi certificati dimostri una mediocre prestazione. La procedura del WHO, per ovvie ragioni, non è attuabile nella maggior parte dei laboratori. Per questi motivi l'*European Concerted Action on Anticoagulation* (ECAA) ha messo a punto una procedura semplificata per la calibrazione del *local PT system* basata su plasmi liofilizzati (20 patologici artificiali e 7 normali) con PT certificati cioè ottenuti con metodo manuale e con entrambe le IRP del WHO, coniglio ed umana[36-40]. Il singolo laboratorio determina il PT di ogni plasma misurato con la locale combinazione reagente/strumento ed i log PT assegnati e quelli misurati sono correlati. Lo *slope* della retta di regressione ortogonale determina l'ISI locale. L'ipotesi è che una sola retta descriva la regressione per normali e scoagulati; se si osserva una deviazione significativa tra le due rette (solo patologici, normali più patologici) si deve applicare la formula di correzione descritta da Tomenson[41] e la cui validità è stata confermata in un grande studio ECAA[42]. È stata proposta una seconda procedura (*direct INR method*)[43] nella quale si utilizzano tre plasmi patologici liofilizzati con valore INR assegnato ed un plasma normale. I PT di questi plasmi sono misurati con la combinazione locale strumento/reagente e riportati su una scala log/log contro gli INR di riferimento. Si calcola la retta di regressione ortogonale dalla quale i PT locali possono essere convertiti in INR senza la necessità di determinare l'MNPT e l'ISI. Il *Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH/SSC) raccomanda una delle due procedure senza indicarne i relativi vantaggi[44]. In un recente lavoro[45] la comparazione tra i due metodi per la correzione dell'INR locale ha dimostrato che la calibrazione locale dell'ISI ha ridotto l'iniziale deviazione da una media del 3,0% allo 0,7% per i centri che usavano tromboplastina umana, mentre per i centri che utilizzavano tromboplastina di coniglio si passava dal 15,9% al 7,5%. Solo per una minoranza di centri che utilizzavano tromboplastina di coniglio *combined* non si osservava alcuna correzione con la calibrazione locale dell'ISI. Viceversa con il *direct INR method* la deviazione per la tromboplastina umana aumentava dal 3,0% al 6,6%, mentre per quella di coniglio riduceva dal 15,9% al 10,0%. Pertanto la calibrazione locale dell'ISI fornisce una correzione dell'INR per la maggior parte dei sistemi. Altri autori non arrivano alle stesse conclusioni; ottengono, infatti, valori di ISI piuttosto diversi utilizzando plasma calibranti differenti[46] e sostengono la necessità di ulteriori verifiche prima di accettare ISI e MNPT forniti da plasma calibranti commerciali. Raccomandano di stimare l'MNPT con un numero adeguato di plasmi (>20), di utilizzare l'ISI fornito dal pro-

duttore in prima istanza, ma di valutarne le prestazioni sulla base dei Controlli di Qualità Esterni, ed eventualmente di comparare il reattivo *existing versus replacement* o di ricorrere all'uso di plasma calibranti commerciali. Le due ultime azioni sono da intraprendere sempre quando il produttore non fornisca l'ISI; comunque i dati ottenuti devono essere valutati e rivalutati alla luce del Controllo Esterno di Qualità.

Anche se l'introduzione dell'INR ha notevolmente migliorato la standardizzazione del PT e, di conseguenza, la gestione terapeutica dei pazienti scoagulati, alcuni problemi rimangono ancora irrisolti. Il singolo plasma può ancora dimostrare differenze di INR apprezzabili se testato in parallelo con differenti reagenti, nonostante un ISI e MNPT ben assegnati. Per esempio alcuni reagenti sono più sensibili di altri alle variazioni di alcuni fattori K dipendenti, come il fattore VII[47-49]. Il PT è influenzato da condizioni preanalitiche come la concentrazione del sodio citrato nelle provette utilizzate per la raccolta del sangue[50-52], o dalla contaminazione della stessa soluzione di sodio citrato da parte di ioni magnesio[53-55]. Perfino la marca delle provette può portare a dei problemi consistenti con variazioni tra laboratorio e laboratorio, nella valutazione dell'INR, che possono superare il 10%[56], limite questo ultimo giudicato insuperabile per garantire una buona gestione della terapia anticoagulante[57]. Il sistema INR è stato disegnato per il monitoraggio dei pazienti in terapia anticoagulante e non è standardizzato per il confronto di PT allungati per altre cause, come l'insufficienza epatica; tromboplastine diverse non danno lo stesso INR per lo stesso campione[58]. Neppure l'espressione in secondi, *ratio* o attività % rende i risultati del PT in epatopatici confrontabili tra loro[59]. E' stato osservato che tromboplastine con ISI vicino ad 1 forniscono, su plasmi di pazienti epatopatici, valori di PT molto simili, indipendentemente dal modo di esprimere il risultato, e quindi anche in INR[60]. Quindi è sufficiente l'adozione di tromboplastine molto sensibili per "armonizzare" i PT degli epatopatici ed esprimere i risultati di tutti i PT in INR. È inoltre da sottolineare che l'accuratezza e la precisione del PT è più importante quando lo si utilizzi a scopo terapeutico piuttosto che diagnostico[61]. Tuttavia quello che sembra un problema puramente accademico può avere un impatto drammatico perché l'INR è una delle variabili dello *score* utilizzato per decidere la priorità dei pazienti in attesa di trapianto di fegato, il *Model for End-stage Liver Disease* (MELD)[62-64]. È stato dimostrato che calibrando le tromboplastine secondo le linee guida WHO, semplicemente utilizzando plasmi di pazienti epatopatici al posto di pazienti in terapia anticoagulante stabilizzata, è possibile ricavare un ISI per *Liver Disease* ed esprimere i risultati in INR_{Liver}, armonizzando il calcolo del MELD *score*[65-67].

Bibliografia

1. Quick AJ. The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. J Biol Chem 1935; 109:73-4.
2. Morawitz P. Die Chemie der Blugerinnung. Ergebnisse der Physiologie 1905; 4:307-423.
3. Quick AJ, Stanley-Brown M, Brancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. Am J Med Sci 1935; 190:501-11.
4. Dam H. The antihaemorrhagic vitamin of the chick. Biochem J 1935; 29:1273-85.
5. Quick AJ. The coagulation defect in sweet clover disease and in the hemorrhagic chick disease of dietary origin: a consideration of the source of prothrombin. Am J Physiol 1937; 118:260-6.
6. Campbell HA, Smith WK, Roberts WL, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. II. The bioassay of hemorrhagic concentrates by following the prothrombin level in the plasma of rabbit blood. J Biol Chem 1941; 138:1-20.
7. Campbell HA, Link KP. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease. IV. The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent. J Biol Chem 1941; 138:21-33.
8. Link KP. The discovery of dicumarol and its sequels. Circulation 1959; 19:97-107.
9. Wright IS, Beck DF, Marple CD. Myocardial infarction and its treatment with anticoagulants; summary of findings in 1031 cases. Lancet 1954; 1:92-5.
10. Lam Po Tang PRLC, Poller L. Oral anticoagulant therapy and its control: an international survey. Thromb Diathes Haemorrh 1975; 34:419-25.
11. Poller L, Taberner DA. Dosage and control of oral anticoagulants: an international survey. Br J Haematol 1982; 51:479-85.
12. Hull R, Hirsh J, Jay R, Carter C, England C, Gent M, et al. Different intensities of oral anticoagulant therapy in the treatment of proximal-vein thrombosis. New Engl J Med 1982; 27:1676-81.
13. Biggs R, Denson KWE. Standardisation of the one-stage prothrombin time for the control of anticoagulant therapy. Br Med J 1967; 1:84-6.
14. Poller L. The British comparative thromboplastin: the use of the national thromboplastin reagent for uniformity of laboratory control of oral anticoagulants and expression of results. ACP Broadsheet 1970; 71:1-6.
15. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 28th report. WHO Tech Rep Ser 1977; 610:14-15 and 45-51.
16. Bangham DR, Biggs R, Brozoviæ M, Denson KWE. Calibration of five different thromboplastin, using fresh and frozen-dried plasma. Thrombos Diathes Haemorrh 1973; 29:228-39.
17. ICTH/ICSH. Prothrombin time standardization: report of the expert panel on oral anticoagulant control. Thromb Haemost 1979; 42:340-7.
18. Thomson JM, Chart LS. The system for laboratory control of oral anticoagulant therapy using the British comparative thromboplastin. Journal of Medical and Laboratory Technology 1970; 27:207-12.
19. Kirkwood TBL. Calibration of reference thromboplastins and standardization of the prothrombin time ratio. Thromb Haemost 1983; 49:238-44.
20. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-third report. World Health Organ Tech Rep Ser 1983; 687:1-184.
21. Thomson JM, Tomenson JA, Poller L. The Calibration

of the Second Primary International Reference Preparation for Thromboplastin (Thromboplastin, Human, Plain, Coded BCT/253). Thromb Haemost 1984; 52: 336-42.
22. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 34th report. World Health Organ Tech Rep Ser 1984; 700:19.
23. Hermans J, van den Besselaar AM, Loeliger EA, van der Velde EA. A collaborative calibration study of reference materials for thromboplastins. Thromb Haemost 1983; 50:712-7.
24. van den Besselaar AM, Bertina RM. Multicenter study of thromboplastin calibration precision: influence of reagent species, composition, and International Sensitivity Index (ISI). Thromb Haemost 1993; 69:35-40.
25. van den Besselaar AM. Multicenter Study of Replacement of the International Reference Preparation for Thromboplastin, Rabbit, Plain. Thromb Haemost 1993; 70: 794-9.
26. Tripodi A, Arbini A, Chantarangkul V, Mannucci PM. Recombinant tissue factor as substitute for conventional thromboplastin in the prothrombin time test. Thromb Haemost 1992; 67:42-5.
27. Tripodi A, Chantarangkul V, Negri B, Clerici M, Mannucci PM. International collaborative study for the calibration of a proposed reference preparation for thromboplastin, human recombinant, plain. On behalf of the Subcommittee on Control of Anticoagulation. Thromb Haemost 1998; 79:439-43.
28. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 47th report. World Health Organ Tech Rep Ser 1998; 878:13.
29. Tripodi A, Poller L, van den Besselaar AM. A proposed scheme for calibration of international reference preparations of thromboplastin for the prothrombin time. Thromb Haemost 1995; 74:1368-9.
30. WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organ Tech Rep Ser 1999; 889:1-111. (Annex 3: Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy http://www.who.int/bloodproducts/publications/WHO_TRS_889_A3.pdf (data di consultazione: 31.3.2009).
31. Thomson JM. Laboratory control of anticoagulant therapy. In: Thomson JM, ed. Blood coagulation and haemostasis: a practical guide, 2nd ed. Edimburg: Churchill Livingstone; 1980. p. 277-330.
32. D'Angelo A, Seveso MP, D'Angelo SV, Gilardoni F, Macagni A, Manotti C. Comparison of two automated coagulometers and the manual tilt-tube method for the determination of prothrombin time. Am J Clin Pathol 1989; 92:321-8.
33. Poggio M, van den Besselaar AM, van der Velde EA, Bertina M. The effect of some instruments for prothrombin time testing on the International Sensitivity Index (ISI) of two rabbit tissue thromboplastin reagents. Thromb Haemost 1989; 62:868-74.
34. Ray MJ, Smith IR. The dependence of the international sensitivity index on the coagulometer used to perform the prothrombin time. Thromb Haemost 1990; 63:424-9.
35. Chantarangkul V, Tripodi A, Mannucci PM. The effect of instrumentation on thromboplastin calibration. Thromb Haemost 1992; 67:588-9.
36. Clarke K, Taberner DA, Thomson JM, Morris JA, Poller L. Assessment of value of calibrated lyophilized plasmas to determine the International Sensitivity Index for coagulometers. Am J Clin Pathol 1992; 45:58-60.
37. Poller L, Triplett DA, Hirsh J, Carroll J, Clarke K. The value of plasma calibrants in correcting coagulometer effects on International Normalized Ratios. An International Multicenter Study. Am J Clin Pathol 1995; 103:358-65.
38. Poller L, Barrowcliffe TW, van den Besselaar AM, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. The European Concerted Action on Anticoagulation (ECAA) evaluation of a set of lyophilized normal plasmas to establish the normal prothrombin time for coagulometer systems. Thromb Haemost 1998; 79:122-8.
39. Poller L, van den Besselaar AM, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. A comparison of artificially-depleted, lyophilised coumarin and fresh coumarin plasmas in thromboplastin calibration. Br J Haematol 1998; 101:462-7.
40. Poller L, van den Besselaar AM, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. The European Concerted Action on Anticoagulation (ECAA): Field studies of coagulometer effects on the ISI of ECAA thromboplastins. Thromb Haemost 1998; 80:615-23.
41. Tomenson JA. A statistician's independent evaluation. In: van den Besselaar AM, Lewis SM, Gralnick HR, Levis SM, eds. Thromboplastin calibration and oral anticoagulant control. Boston: Martinus-Nijhoff Publishers; 1984. p. 87-108.
42. Poller L, van den Besselaar AM, Jespersen J, Tripodi A, Houghton D. Correction for lack of coincidence of normal and abnormal calibration slopes in ISI determination. Thromb Haemost 1999; 81:935-9.
43. Houbouyan L, Goguel AF. Long term French experience in INR standardization by a procedure using plasma calibrants. Am J Clin Pathol 1997; 108:83-9.
44. van den Besselaar AM, Barrowcliffe TW, Houbouyan-Réveillard LL, Jespersen J, Johnston M, Poller L, et al. Guidelines on preparation, certification and use of certified plasmas for ISI calibration and INR determination. J Thromb Haemost 2004; 2:1946-53.
45. Poller L, Keown M, Ibrahim S, van den Besselaar AM, Roberts C, Stevenson K, et al. European concerted action on anticoagulation. Comparison of local International Sensitivity Index calibration and 'Direct INR' methods in correction of locally reported International Normalized Ratios: an international study. J Thromb Haemost 2007; 5:1002-9.
46. Favaloro EJ, Hamdam S, McDonald J, McVicker W, Ule V. Time to think outside the box? Prothrombin time, international normalised ratio, international sensitivity index, mean normal prothrombin time and measurement of uncertainty: a novel approach to standardisation. Pathology 2008; 40:277-87.
47. Bader R, Mannucci PM, Tripodi A, Hirsh J, Keller F, Solleder EM, et al. Multicenter evaluation of a new PT reagent based on recombinant human factor and synthetic phospholipids. Thromb Haemost 1994; 71:292-9.
48. Testa S, Morstabilini G, Fattorini A, Galli L, Denti N, D'Angelo A. Discrepant sensitivity of thromboplastin reagents to clotting factor levels explored by the prothrombin time in patients on stable oral anticoagulant treatment: impact on the international normalized ratio system. Haematologica 2002; 87:1265-73.
49. Remijn JA, Lucas S, Wildeboer B, van Suijlen JDE,

Adriaansen HJ. Strongly increased International Normalized Ratio with recombinant Neoplastin R® Compared with tissue extract Neoplastin Plus in patients initiating oral anticoagulant therapy: implication for anticoagulant dosage. Clin Chem 2008; 54:1929-31.
50. Duncan EM, Casey CR, Duncan BM, Llovd JV. Effect of concentration of trisodium citrate anticoagulant on calculation of the international normalised ratio and the international sensitivity index of thromboplastin. Thromb Haemost 1994; 72:84-8.
51. 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.
52. Chantarangkul V, Tripodi A, Clerici M, 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.
53. van den Besselaar AM, Van Dam W, Sturk A, Bertina RM. Prothrombin time ratio is reduced by magnesium contamination in evacuated blood collection tubes. Thromb Haemost 2001; 85:647-50.
54. van den Besselaar AM, Witteveen E, Meeuwisse-Braun J, van der Meer FJ. The influence of exogenous magnesium chloride on the apparent INR determined with human, rabbit, and bovine thromboplastin reagents. Thromb Haemost 2003; 89:43-7.
55. van den Besselaar AM, Rutten WPF, Witteveen E. Effect of magnesium contamination in evacuated blood collection tubes on the prothrombin time test and ISI calibration using recombinant human thromboplastin and different types of coagulometer. Thromb Res 2005; 115:239-44.
56. van den Besselaar AM, Hoekstra MMCL, Witteveen E, Didden JH , van der Meer FJM. Influence of blood collection systems on the prothrombin time and International Sensitivity Index determined with human and rabbit thromboplastin reagents. Am J Clin Pathol 2007; 127:724-9.
57. Poller L, Keown M, Chauhan N, van den Besselaar AM, Tripodi A, Shiach C, et al. European Concerted Action on Anticoagulation: a multicentre calibration study of WHO international reference preparations for thromboplastin, rabbit (RBT/90) and human (rTF/95). J Clin Pathol 2005; 58:667-9.
58. Kovacs MJ, Wong A, MacKinnon K, Weir K, Keeney M, Boyle E, et al. Assessment of the validity of the INR system for patients with liver impairment. Thromb Haemost 1994; 71:727-30.
59. Robert A, Chazouillères O. Prothrombin time in liver failure: time, ratio, activity percentage, or international normalized ratio? Hepatology 1996; 24:1392-4.
60. Ts'ao C, Swedlund J, Neofotistos D. Implication of use of low international sensitivity index thromboplastins in prothrombin time testing. Arch Pathol Lab Med 1994; 118:1183-7.
61. Koeple JA. Is international normalized ratio also "valid" for prothrombin time measured in patients not receiving oral anticoagulants? Arch Pathol Lab Med 1994; 118: 1181-2.
62. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee: model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. Gastroenterology 2003; 124:91-6.
63. Murray KF, Carithers RL Jr. AASLD practice guidelines: evaluation of the patient for liver transplantation. Hepatology 2005; 41:1407-32.
64. Trotter JF, Brimhall B, Arjal R, Phillips C. Specific laboratory methodologies achieve higher model for end stage liver disease (MELD) scores for patients listed for liver transplantation. Liver Transpl 2004; 10:995-1000.
65. Tripodi A, Chantarangkul V, Primignani M, Fabris F, Dell'Era A, Sei C, et al. The international normalized ratio calibrated for cirrhosis (INR Liver) normalizes prothrombin time results for model for end-stage liver disease calculation. Hepatology 2007; 46:520-7.
66. Bellest L, Eschwège V, Poupon R, Chazouillères O, Robert A. A modified International Normalized Ratio as an effective way of prothrombin time standardization in hepatology. Hepatology 2007; 46:528-34.
67. Tripodi A, Chantarangkul V, Tripodi A, Chantarangkul V, Mannucci PM. The International Normalized ratio to prioritize patients for liver transplantation. Problems and possible solutions. J Thromb Haemost 2008; 6: 243-8.