# La variabilità preanalitica dei test coagulativi

**G. Lippi[a], G. Salvagno[a], D.M. Adcock[b], M. Franchini[c], E.J. Favaloro[d]**

[a]*Sezione di Chimica Clinica, Università di Verona, Italia*
[b]*Esoterix Coagulation, Englewood, Colorado, USA*
[c]*Servizio di immunoematologia e trasfusione, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Italia*
[d]*Department of Haematology, ICPMR, Westmead Hospital, Westmead, NSW, Australia*

**Riassunto**

**L'approccio alla diagnosi, alla terapia ed al monitoraggio delle patologie trombotiche ed emorragiche richiede un uso appropriato e discrezionale delle risorse di laboratorio. La qualità totale nella diagnostica emocoagulativa rappresenta un requisito necessario per il conseguimento di risultati clinicamente attendibili. Malgrado vi sia una comune percezione che la variabilità preanalitica possa incidere negativamente sui risultati dei test emocoagulativi, esistono ad oggi pochi studi che abbiano affrontato in dettaglio questo aspetto. I problemi maggiori, straordinariamente amplificati rispetto alla tradizionale diagnostica di laboratorio per la peculiarità dei test eseguiti, sono catalogati come "variabili preanalitiche" e comprendono le modalità di raccolta del campione (stasi venosa, dispositivo per il prelievo, calibro dell'ago, tipo di provetta, rapporto sangue/anticoagulante), la gestione della provetta dopo il prelievo (agitazione, modalità e tempo di trasporto, centrifugazione, conservazione) e variabili non sempre riconducibili a prassi inappropriate per lo svolgimento delle fasi precedentemente descritte (es. emolisi, lipemia, ittero, contaminazione da eparina o altri liquidi di infusione). Tutte queste variabili possono compromettere l'integrità del campione e inficiare la validità dei test eseguiti, con drammatiche ripercussioni di natura clinica ed economica.**

**Summary**

**Preanalytical variability of coagulation testing**

The approach to diagnosis, therapy and monitoring of bleeding and thrombotic disorders requires appropriate and discretionary use of laboratory resources. The total quality in coagulation testing is a prerequisite for achieving clinically reliable results. Although there is widespread perception that the preanalytical variability can adversely impact on results of coagulation tests, only a few studies have addressed this issue in detail. The major issues, extraordinarily magnified for the peculiarity of the tests, include the procedures used for collecting samples (venous stasis, devices, needle gauge, the type of the primary tube, the blood to anticoagulant ratio), the management of the tube after collection (mixing, time and mode of transport, spinning, storage) and other miscellanea variables which might variably result from inappropriate collection and handling of the specimen (eg hemolysis, lipemia, jaundice, contamination with heparin or other liquids). All these variables can affect the integrity of the specimen and affect the reliability of test results, thereby producing negative clinical and economic consequences.

*Key-words:* analysis, coagulation, errors, hemostasis, preanalitical variability.

## Introduzione

Analogamente ad altri ambiti della medicina di laboratorio, i test di diagnostica emocoagulativa rappresentano un momento essenziale per lo screening, la diagnosi, la terapia ed il monitoraggio dei disturbi emostatici, sia sul versante emorragico, sia su quello trombotico[1,2]. La qualità totale nella diagnostica emocoagulativa rappresenta un requisito necessario per il conseguimento di risultati clinicamente attendibili. Come in altri ambiti della diagnostica in vitro, i test emocoagu-

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

*Corrispondenza a:* Prof. Giuseppe Lippi, Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, Piazzale Scuro n.10, 37134 Verona. Tel. 045-8124308, fax 045-8201889, e-mail: giuseppe.lippi@univr.it; ulippi@tin.it

**Tabella I.** Variabilità biologica intraindividuale (CVw%), interindividuale (CVg%), Imprecisione (I%), Bias (B%) ed Errore Totale Desiderabile (ET%) dei principali parametri emocoagulativi.

| Analita | Variabilità biologica | | Specificazioni di qualità | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | CVw | CVg | I(%) | B(%) | TE(%) |
| Antitrombina | 5,2 | 15,3 | 2,6 | 4,0 | 8,3 |
| Conta piastrinica | 9,1 | 21,9 | 4,6 | 5,9 | 13,4 |
| Fattore di Von Willebrand | 5,0 | 18,0 | 2,5 | 4,7 | 8,8 |
| Fattore V | 3,6 | – | 1,8 | – | – |
| Fattore VII | 6,8 | 19,4 | 3,4 | 5,1 | 10,7 |
| Fattore VIII | 4,8 | 19,1 | 2,4 | 4,9 | 8,9 |
| Fattore X | 5,9 | – | 3,0 | – | – |
| Fibrinogeno | 10,7 | 15,8 | 5,4 | 4,8 | 13,6 |
| Plasminogeno | 7,7 | – | 3,9 | – | – |
| Proteina C | 5,8 | 55,2 | 2,9 | 13,9 | 18,7 |
| Proteina S | 5,8 | 63,4 | 2,9 | 15,9 | 20,7 |
| Tempo di Prohrombina (PT) | 4,0 | 6,8 | 2,0 | 2,0 | 5,3 |
| Tempo di tromboplastina parziale attivata (APTT) | 2,7 | 8,6 | 1,4 | 2,3 | 4,5 |

lativi sono soggetti ad una variabilità legata prevalentemente alle procedure della fase preanalitica, all'incertezza analitica ed alla corretta interpretazione dei risultati[3,4]. Nondimeno, data la peculiarità del campione biologico e delle tecniche analitiche, vari problemi che possono insorgere nell'ambito della fase preanalitica possono incidere in modo determinante sulla qualità dei risultati[5-7]. Complessivamente, la frequenza degli errori preanalitici identificati in campioni destinati ad analisi emocoagulative è prossima al 5-6%. Malgrado la maggiore frequenza di questa tipologia di errori sia riscontrabile in campioni trasmessi da reparti pediatrici, la prevalenza generale è comunque molto simile tra le diverse unità operative. I problemi osservati più di frequente riguardano campioni non pervenuti (49%), emolisi in vitro (20%), campioni coagulati (14%) o con inappropriato rapporto tra sangue ed anticoagulante (14%). Stratificando le non conformità in relazione al reparto di provenienza, i campioni non pervenuti sono la causa prevalente per reparti di terapia intensiva, dipartimenti di medicina interna o chirurgia, mentre i campioni coagulati ed emolizzati sono prevalenti nei reparti pediatrici e nelle strutture di terapia d'urgenza[8].

A prescindere da un serie di evidenze e considerazioni pratiche che saranno descritte dettagliatamente in seguito, il problema maggiore nel gestire l'incertezza della fase preanalitica è rappresentato dal criterio adottato per valutare l'idoneità dei campioni. Ciò si riflette, nella pratica quotidiana, nella necessità di stabilire un limite massimo di "scostamento" del risultato (*bias*) rispetto alle condizioni ideali di campionamento. Malgrado siano stati suggeriti diversi approcci in merito, quello più consono è improntato all'utilizzo del criterio oggettivo delle specificazioni di qualità (Imprecisione, Bias, Errore Totale Desiderabile), derivate dalla variabilità biologica e riassunte in Tabella I[9]. In sintesi, per ogni analita è suggerito un criterio oggettivo per fissare delle regole di controllo (*control rules*) che consentano di definire con relativa certezza quando una determinata fase di tutto il processo diagnostico (preanalitica, analitica, postanalitica) s'associa a variazioni del risultato atteso che eccedono un preordinato livello qualitativo. Quando una procedura è svolta nel modo corretto, la variazione dovrebbe essere compresa nell'ambito di limiti predefiniti; maggiore è lo scostamento da tali limiti, maggiore è l'imprecisione introdotta nel risultato finale del test.

## Prelievo del campione

Il prelievo del campione rappresenta la criticità maggiore nell'ambito della diagnostica in vitro, come testimoniato dal fatto che la maggior parte degli errori e delle incertezze si generano proprio durante questa fase[10] (Tab. II). Ciò è ancor più vero nell'ambito della diagnostica emocoagulativa, ove la raccolta di campioni idonei per l'esame rappresenta requisito essenziale ed imprescindibile per ottenere risultati attendibili. Stime attendibili, dedotte da studi retrospettivi o prospettici, dimostrano che la maggioranza dei problemi preanalitici si concentra sulla raccolta di campioni non idonei per qualità (matrice non idonea, emolisi in vitro, presenza di coaguli, lipemia) o quantità (campioni insufficienti, rapporto non idoneo tra sangue ed anticoagulante)[10]. Nell'ambito della medicina di laboratorio, il prelievo ematico è atto irrinunciabile al fine di ottenere campioni biologici da analizzare. Nondimeno, l'utilizzo di procedure e/o materiali non idonei può determinare un drammatico abbattimento della qualità del campione, fino a renderlo completamente inidoneo per l'analisi. Tra gli "incidenti" che più di frequente possono svilupparsi in questa delicato processo della fase preanalitica vanno menzionati l'emolisi, la coagulazio-

**Tabella II.** Criticità maggiori nell'ambito della fase preanalitica dei test emocoagulativi.

| Prelevamento del campione | Trasferimento del campione | Trattamento del campione |
|---|---|---|
| - Stasi venosa | - Mezzo di trasporto | - Condizioni di centrifugazione |
| - Dispositivo per il prelievo | - Temperatura | - Stratificazione del plasma |
| - Dimensione dell'ago | - Umidità | - Conservazione |
| - Tubo primario/Matrice | - Tempo | |
| - Rapporto sangue-anticoagulante | | |

ne (totale o parziale) del campione, la raccolta di campioni con un rapporto inappropriato tra sangue ed anticoagulante. Nondimeno, alcune non idoneità generiche riscontrate durante l'analisi dei campioni in laboratorio assumono rilievo maggiore nella diagnostica emocoagulativa, e concernono soprattutto la raccolta di campioni non idonei per rapporto tra sangue ed anticoagulante e la coagulazione parziale o totale del campione a seguito del prelievo[8]. Malgrado vi sia accordo (quasi) unanime sulla definizione di campione non idoneo per i test emocoagulativi, non sempre è possibile ricondurre la natura dell'errore ad una causa specifica.

Uno dei maggiori problemi nella raccolta dei campioni di sangue periferico riguarda il tipo di dispositivo. Malgrado le raccomandazioni e le linee guida nazionali ed internazionali suggeriscano l'utilizzo dei consueti dispostivi basati su camicia ("*holder*") monouso ed ago dritto, molto spesso la raccolta dei campioni, soprattutto nelle unità operative di medicina d'urgenza, terapia intensiva e nei reparti pediatrici, avviene utilizzando dispositivi a farfalla ("*butterfly*"). Malgrado non siano direttamente evidenziabili variazioni significative nei comuni test emocoagulativi associate all'uso dei suddetti dispositivi (il bias è sempre compreso nell'ambito delle specificazioni di qualità dell'errore totale desiderabile riportato in Tabella I)[11], esiste una serie di controindicazioni pratiche che dovrebbero scoraggiarne l'uso. Esse comprendono il costo superiore a quello dei dispositivi convenzionali, la maggior probabilità di generare campioni non idonei (soprattutto emolitici o con inappropriato rapporto tra sangue ed anticoagulante per riempimento incompleto del tubo primario), la possibilità tutt'altro che remota di un'attivazione dell'emostasi primaria e secondaria durante il transito del sangue nel segmento di tubo che congiunge l'ago e la provetta.

Un secondo problema, comune ad altri settori della diagnostica in vitro, è rappresentato dal calibro dell'ago utilizzato per la raccolta del campione. Malgrado i risultati dei comuni test emocoagulativi (tempo di protrombina, PT e tempo di tromboplastina parziale attivata, APTT) tendano ad accorciarsi utilizzando aghi di piccolo calibro (≤ 23 Gauge) per effetto di una possibile attivazione dell'emostasi secondaria in vitro, tale variazione appare comunque compresa nell'ambito delle specificazioni di qualità. Analoghe considerazioni valgono per la conta piastrinica e per la determinazione del D-dimero, sicché è possibile concludere che aghi di calibro inferiore a 21 Gauge non sembrano generare una variabilità significativa nei parametri utilizzati[12].

Malgrado sia ben noto che il prolungato posizionamento del laccio emostatico possa generare stasi venosa e conseguentemente modificare la concentrazione di vari analiti nel sangue, questa causa di variabilità preanalitica è spesso sottovalutata durante il prelevamento. In sostanza, la stasi prolungata altera sostanzialmente tutti i parametri ematochimici, compresi quelli coagulativi. E' stato infatti dimostrato che tutti i comuni test emocoagulativi sono alterati dopo un minuto di stasi. Le variazioni s'amplificano ulteriormente dopo tre minuti di mantenimento del laccio, fino superare i limiti di accettabilità (errore totale desiderabile) per PT, fibrinogeno e D-dimero[13].

Originariamente ideato negli anni '70, l'ordine di prelevamento delle provette (convenzionalmente noto come "*order of draw*") fu diffusamente raccomandato per prevenire la contaminazione dei tubi primari. A seguito della rivoluzione tecnologica nei materiali e nelle tecniche di prelievo, nel 2003 il *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) deliberò una versione pressoché definitiva e semplificata, che prevede la raccolta in sequenza di provette destinate ad emocoltura, seguite da provette di siero, provette per esami di coagulazione e provette contenenti altri anticoagulanti o additivi[14]. Qualora fosse previsto il prelievo di una sola provetta destinata ad esami di coagulazione, le vecchie indicazioni prevedevano che venisse anteposta una provetta di siero al fine di evitare il riempimento insufficiente o la contaminazione da tromboplastina rilasciata durante il prelievo. Tuttavia, tali indicazioni non trovano più riscontro nelle linee guida attuali della CLSI o nelle evidenze della pratica[15,16].

La raccolta in contenitori non idonei all'esame è un aspetto molto importante in biochimica clinica, che assume tuttavia maggior rilievo in diagnostica ematologia e, soprattutto, coagulativa. Per le tradizionali analisi biochimiche è possibile utilizzare diversi matrici (siero o plasma), per quelle ematologiche la matrice raccomandata di scelta è plasma EDTA ($K_2$ EDTA), malgrado anche plasma citrato e plasma eparinato possano essere utilizzati con opportune avvertenze (opportuna correzione dei risultati nel plasma citrato, impossibilità di svolgere alcune analisi citochimiche in pre-

senza di plasma eparinato). Per i test coagulativi, invece, l'unica matrice idonea è plasma citrato, in quanto solo l'utilizzo di questo anticoagulante consente la ricalcificazione del plasma, *conditio sine qua non* per l'esecuzione dei comuni test emocoagulativi. Tale considerazioni non riguardano ovviamente eventuali test immunometrici che appartengono alla sfera della diagnostica emocoagulativa (es. determinazioni antigeniche dei fattori della coagulazione, D-dimero, eccetera), ma solo i test in cui sia richiesta l'attivazione della cascata coagulativa in vitro. A causa della progressiva centralizzazione delle analisi in *core laboratories* e della necessità d'utilizzare solo ed esclusivamente plasma citrato, un problema tangibile emerso di recente è il riconoscimento della matrice dei campioni secondari e delle eventuali aliquote prodotte in punti prelievo decentralizzati e successivamente inviati al *core laboratory*. In presenza di risultati dubbi o francamente inattendibili, l'eventualità che la matrice in analisi sia diversa da plasma citrato (ad esempio siero, plasma eparinato o plasma EDTA) deve sempre essere considerata ed eventualmente esclusa[17]. A questo proposito, sono stati recentemente proposti alcuni algoritmi basati sulla determinazione di sodio, potassio, calcio e/o cloro e/o magnesio nella matrice in esame, che consentirebbero di distinguere con efficienza prossima al 100% il plasma citrato da plasma EDTA, plasma eparinato o siero[18]. Nel plasma EDTA, infatti, sodio e cloro sono significativamente diminuiti rispetto al siero ed al plasma eparinato, il potassio è sempre >14 mmol/L, mentre magnesio e calcio sono virtualmente indosabili. Al contrario, la concentrazione di potassio, cloro, calcio e magnesio è sostanzialmente diminuita nel plasma citrato rispetto al siero ed al plasma eparinato, mentre quella del sodio è considerevolmente aumentata. L'utilizzo di questi algoritmi, integrato ai comuni test coagulativi, consentirebbe di facilitare il riconoscimento di matrici non idonee, convalidando oggettivamente l'eventuale impossibilità tecnica ad eseguire l'analisi[18].

A prescindere dalla matrice non idonea, un'ulteriore fonte di variabilità preanalitica, determinante ai fini della qualità del risultato, è rappresentata dall'opportuno rapporto tra sangue ed anticoagulante (sodio citrato)[19]. La raccolta di campioni biologici con alterato rapporto tra sangue e anticoagulante, soprattutto a favore del secondo, determina un eccesso di sodio citrato nel campione, che sequestra parte dello ione reintrodotto durante la ricalcificazione necessaria all'espletamento dei test coagulativi. Pertanto, un riempimento non idoneo della provetta primaria può allungare significativamente i test di coagulazione, producendo risultati che potrebbero essere interpretati come "falsi positivi". Pur non esistendo indicazioni definitive ed univoche sul limite minimo di accettabilità di campioni con rapporto inappropriato tra sangue ed anticoagulante, Reneke e colleghi hanno dimostrato che i risultati del PT su campioni normali sono attendibili in tubi primari riempiti fino (ma non al di sotto) del 65% della capacità. Per valori patologici di PT, i risultati sono accurati in tubi primari riempiti fino (ma non al di sotto) dell'80% usando tromboplastine moderatamente sensibili, e fino al 90% usando tromboplastine altamente sensibile. Analogamente, prolungamenti significativi dell'APTT si osservano in tubi primari riempiti al di sotto del 90% della capacità[20]. Utilizzando tubi primari contenenti sodio citrato al 3,8%, differenze significative in PT e APTT si osservano in campioni riempiti a meno dell'80% e 90% della capacità, rispettivamente[21,22]. Tale effetto è meno evidente quando i campioni siano prelevati in sodio citrato al 3,2%. Nei campioni pediatrici, il riempimento non deve essere inferiore al 90%[23]. Secondo le attuali raccomandazioni del CLSI, i campioni dovrebbero essere comunque scartati ogni qualvolta il riempimento della provetta sia inferiore al 90% della capacità nominale[19]. Verosimilmente, questa sembra la raccomandazione più idonea, poiché non sempre l'operatore è a conoscenza degli esami richiesti per quel campione o della sensibilità dei reagenti utilizzati. Per quanto concerne la concentrazione dell'anticoagulante nel tubo primario, il CLSI raccomanda attualmente l'utilizzo di provette contenenti sodio citrato alla concentrazione di 0,105-0,109 mM (3,2%)[19]. Nondimeno, in alcune realtà è ancora diffuso l'utilizzo di provette contenenti sodio citrato alla concentrazione di 0,129 mM (3,8%). In questo caso, è opportuno ricordare che, malgrado esista una sostanziale concordanza dei risultati, nei campioni raccolti in sodio citrato 0,129 mM il PT e l'APTT sono allungati, mentre il valore di fibrinogeno è sottostimato, fino ad eccedere in tutti i casi le specificazioni di qualità[24]. D'altronde, campioni raccolti in sodio citrato 0,129 mM (3,8%) sembrano essere più consoni per la valutazione della resistenza all'aspirina, utilizzando il PFA-100[25]. La raccomandazione più opportuna in questa circostanza è che ogni laboratorio sviluppi i propri intervalli di riferimento sulla base della concentrazione di anticoagulante presente nei tubi primari, che deve essere ovviamente la medesima nei campioni raccolti per la calibrazione dei test e nei campioni in esame[7]. Per quanto concerne l'agitazione del tubo primario immediatamente dopo il prelievo, il CLSI consiglia di invertire il tubo primario da 4 a 6 volte immediatamente dopo il prelevamento. Nondimeno, anche un numero minore d'inversioni del campione (da 2 a 4) sembrerebbero sufficienti a garantire un idoneo miscelamento di sangue ed anticoagulante, sempre che la provetta sia riempita correttamente[26].

## Trasporto del campione

Un'ulteriore variabile che influenza l'attendibilità dei test coagulativi riguarda le modalità di trasporto dei campioni, sia per quanto concerne il mezzo con cui le provette sono trasferite dal punto di prelievo al laboratorio che esegue l'esame, sia per le modalità ottimali per conservare i campioni per garantirne l'integrità, e che saranno trattate più diffusamente in seguito (Tab. II).

È lapalissiano che i campioni biologici, soprattutto quelli destinati ad esami emocoagulativi, dovrebbero essere trattati più delicatamente possibile durante tutto il loro percorso, evitando eccessivi scuotimenti, frenate o accelerazioni improvvise, rispettando idonee condizioni di temperatura ed umidità[19]. I sistemi di trasporto pneumatico dei campioni si stanno diffondendo rapidamente nelle strutture ospedaliere, poiché consentono di standardizzare il trasporto, limitare l'intervento umano in questa fase e ridurre contestualmente il *turnaround time* (TAT). Dyszkiewicz e colleghi hanno dimostrato che il sistema di trasporto pneumatico potrebbe determinare una attivazione in vitro delle piastrine, riflessa dall'accorciamento del tempo di chiusura del PFA-100 (soprattutto utilizzando collagene ed adrenalina come attivatori)[27]. In uno studio recente di Wallin e colleghi[28] è stato tuttavia dimostrato che i principali test emocoagulativi (PFA-100, PT, APTT e fibrinogeno) eseguiti su campioni trasferiti al laboratorio mediante un sistema di trasporto pneumatico non subiscono alterazioni significative. Al contrario, sono state osservate variazioni importanti nei parametri tromboelastografici, soprattutto nel tempo di formazione del coagulo, il che potrebbe sottendere una parziale (ma probabilmente insignificante in termini clinici) preattivazione della cascata coagulativa in vitro. Sulla base dei dati della letteratura si può quindi concludere che il sistema di trasporto pneumatico non sembrerebbe alterare significativamente l'integrità dei campioni destinati alla routine emocoagulativa. I risultati di analisi più sensibili, come ad esempio tromboelastrografia e funzionalità piastrinica in vitro (test di aggregazione), potrebbero essere invece influenzati da questa modalità di trasporto e sarebbe quindi auspicabile prevedere una procedura specifica di trasferimento in laboratorio.

## Trattamento del campione

La centrifugazione dei campioni rappresenta un aspetto critico per tutta la diagnostica in vitro ed, a maggior ragione, per quella coagulativa. Per quanto concerne le condizioni ottimali, il CLSI suggerisce di centrifugare i campioni a temperatura ambiente, a 1500xg per almeno 15 minuti[19]. Ulteriori studi hanno tuttavia dimostrato che un tempo di centrifugazione inferiore, compreso tra 5 e 10 minuti, non modifica significativamente i risultati[29], così come non si introducono variazioni significative anche utilizzando temperature d'esercizio inferiori (4° C o 12° C) a quella consigliata[30]. Attenzione dovrebbe anche essere prestata alla possibile stratificazione del plasma durante la centrifugazione, giacché confrontando il plasma in superficie con quello in profondità, i valori di PT sono più corti e la concentrazione del fibrinogeno è contestualmente maggiore[31], pur rimanendo tale variabilità compresa nell'ambito delle specificazioni di qualità. Per quanto concerne il filtraggio del plasma, quest'operazione è oggi vivamente sconsigliata poiché può inficiare l'attendibilità di molti test coagulativi[32,33].

## Stabilità del campione

La stabilità del campione per la determinazione dei test di coagulazione prevede l'analisi di alcune variabili quali il tempo che intercorre fra il prelievo e la separazione della parte corpuscolata del plasma e la temperatura di conservazione, prima e dopo la centrifugazione. Le attuali raccomandazioni della CLSI stabiliscono che: a) i campioni per PT dovrebbero essere centrifugati entro 24 ore dal prelievo se conservato a temperatura ambiente; b) i campioni per APTT dovrebbero essere analizzati entro 4 ore dal prelievo; c) i campioni per altri test di coagulazione dovrebbero essere centrifugati entro 4 ore dal prelievo e conservati sia a temperatura ambiente che a 2-4 °C[19,34]. Alcuni autori hanno tuttavia suggerito limiti più stringenti per la conservazione dei campioni non centrifugati e destinati alla determinazione di APTT, PT e fibrinogeno, indicando un limite massimo di 6 ore per un *range* di temperature comprese tra 4 e 24°C[35,36]. Altri autori hanno invece evidenziato una sostanziale stabilità dei campioni non centrifugati fino a 24-28 ore, evidenziando delle variazioni solo per il fattore VIII, fattore V e proteina S quando i campioni sono conservati a temperatura di 2-4°C[37-39]. E' quindi ragionevole supporre che la non corretta conservazione dei campioni durante il trasporto e prima della centrifugazione potrebbe determinare errori nella approccio diagnostico all'emofilia A, imputabili a variazioni della concentrazione del fattore VIII e del fattore di von Willebrand (VWF), proteina che svolge un ruolo cardine nella stabilizzazione del fattore VIII.

La stabilità dei campioni centrifugati rappresenta un aspetto cardine nella gestione dei test che non sono eseguiti di routine, quali ad esempio la determinazione dei fattori della coagulazione per la diagnosi di carenze (ad esempio emofilia A o malattia di von Willebrand). Diversi autori hanno sollevato dubbi sull'attendibilità delle analisi eseguite su campioni congelati a -20° C o -80° C per un periodo superiore a 6 mesi, sottolineando il rischio di incorrere in diagnosi errate[40,41]. Woodhams e colleghi hanno dimostrato la stabilità dei fattori della coagulazione per almeno tre mesi quando conservati a -20°C, mentre essi risultano stabili fino a 2 anni conservandoli a -80°C[40]. Minori informazioni sono disponibili per periodi di conservazione maggiori a due anni, il che sottolinea la necessità di studi specificatamente indirizzati a valutare questo aspetto, la cui importanza è sostanziale nella determinare la validità di studi multicentrici e prospettici in cui è prevista la conservazione dei campioni anche per diversi anni.

La determinazione del VWF sembra più affidabile quando i campioni sono conservati anche per giorni a temperatura ambiente (ciò vale sia per campioni di sangue intero, sia per campioni di plasma), anche se nei

campioni di sangue intero si assiste ad un progressivo aumento dei valori, verosimilmente imputabile al rilascio cellulare della proteina[42]. Al contrario, la conservazione dei campioni di sangue intero a 4° C è sconsigliata, in quanto determina un'attivazione dell'emostasi che si accompagna ad aumento di VWF e dei fattori VII ed VIII[38,43-45].

## Conclusioni

Nel corso degli ultimi decenni il ruolo del laboratorio clinico s'è andato affermando sempre più prepotentemente nell'ambito del processo decisionale clinico. Contestualmente, è cresciuta la necessità di disporre di standard qualitativi prestabiliti e definiti per ottimizzare l'organizzazione e la gestione delle attività. E' innegabile che i progressi della tecnologia e dell'informatica, l'introduzione di standard di qualità atti a monitorare diverse fasi di processo e la diffusione di programmi di valutazione di qualità interna ed esterna, abbiano contribuito al raggiungimento di una maggiore attendibilità e confidenza nella fase analitica, riducendo la probabilità d'errore ed incrementando contestualmente la precisione e l'accuratezza dei risultati[46-48]. I progressi compiuti per ottimizzare l'efficienza e l'efficacia delle fasi extra-analitiche, soprattutto della fase preanalitica, sono stati tuttavia meno soddisfacenti[3-7]. A rendere ancora più complessa la situazione ha contribuito la parziale riorganizzazione dei servizi di medicina di laboratorio, spesso strutturati in forma di *network* o reti territoriali che, moltiplicando i centri prelievi in periferia, ha contribuito a generare un netto scollamento tra la fase preanalitica e quella analitica.

La fase preanalitica presenta diverse criticità, che comprendono le procedure di raccolta, trasporto, trattamento e conservazione del campione. La criticità della gestione della fase preanalitica per i test emocoagulativi è ben nota, sia per quanto riguarda lo studio della funzionalità piastrinica, sia per l'analisi della cascata coagulativa. Contestualmente, l'integrità del campione rappresenta condizione indispensabile per ottenere un "buon" referto clinico[49]. Un ampio consenso internazionale[19] e nazionale[50-52] ha consentito la produzione di linee guida specifiche sulla gestione della fase pre-analitica per monitorare ogni processo di questa fase cruciale dell'attività di laboratorio. Anche l'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) ha riconosciuto il problema, emanando una serie di norme ed indicazioni atte ad integrare un sistema di gestione della qualità per migliorare la gestione dei processi. Accanto ad indicazioni generiche, le ISO 15189 hanno la finalità di attestare la capacità dei laboratori clinici di fornire, attraverso personale qualificato e competente, un servizio di consulenza clinica supportato da adeguata tecnologia diagnostica, capace di coprire tutti gli aspetti delle indagini di laboratorio, e quindi comprensivo della fase preanalitica. Il rispetto delle attuali indicazioni e raccomandazioni, accanto ad una traslazione del concetto di *risk management* all'attività di laboratorio sono elementi essenziali per ridurre l'incertezza della fase preanalitica, parte complessa ma irrinunciabile nell'ambito del processo diagnostico.

## Bibliografia


1. Lippi G, Franchini M, Guidi GC. Diagnostic approach to inherited bleeding disorders. Clin Chem Lab Med 2007; 45:2-12.
2. Favaloro EJ, Lippi G, Franchini M. Laboratory diagnostics in thrombosis and hemostasis: the past, the present, and the future. Semin Thromb Hemost 2008; 34:579-83.
3. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzzi C, Plebani M. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. Clin Chem Lab Med 2006; 44:358-65.
4. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. Clin Chem Lab Med 2007; 45:720-7.
5. Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Salvagno GL, Poli G, Guidi GC. Quality and reliability of routine coagulation testing: can we trust that sample? Blood Coagul Fibrinolysis 2006; 17:513-9.
6. Favaloro EJ. Pre-analytical variables in coagulation testing. Blood Coag Fibrinolysis 2007; 18:86-9.
7. Favaloro EJ, Lippi G, Adcock DM. Preanalytical and postanalytical variables: the leading causes of diagnostic error in hemostasis? Semin Thromb Hemost 2008; 34: 612-34.
8. Salvagno GL, Lippi G, Bassi A, Poli G, Guidi GC. Prevalence and type of pre-analytical problems for inpatients samples in coagulation laboratory. J Eval Clin Pract 2008; 14:351-3.
9. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Invest 1999; 59:491-500.
10. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. Clin Lab 2006; 52:217-30.
11. Lippi G, Salvagno GL, Guidi GC. No influence of a butterfly device on routine coagulation assays and D-dimer measurement. J Thromb Haemost 2005; 3:389-91.
12. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2006; 17:557-61.
13. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2005; 16:453-8.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedure for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard. Wayne, PA: CLSI document H3-A5, 2003.
15. Lippi G, Guidi GC. Effect of specimen collection on routine coagulation assays and D-dimer measurement. Clin Chem 2004; 50:2150-2.
16. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Are discard tubes necessary in coagulation studies? Lab Med 1997; 28: 530-3.
17. Favaloro EJ, Bonar R, Duncan E, Earl G, Low J, Aboud M, et al., on behalf of the RCPA QAP in Haematology

Haemostasis Committee. Mis-identification of factor inhibitors by diagnostic haemostasis laboratories: recognition of pitfalls and elucidation of strategies. A follow up to a large multicentre evaluation. Pathology 2007; 39:504-11.
18. Lippi G, Salvagno GL, Adcock DM, Gelati M, Guidi GC, Favaloro EJ. Right or wrong sample received for coagulation testing? Tentative algorithms for detection of an incorrect type of sample. Int J Lab Hematol 2009 Feb 7 [Epub ahead of print].
19. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchant K, Marlar RA, Szamosi DI, Warunek DJ. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline-Fifth Edition. Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI document H21-A5, 2008.
20. Reneke J, Etzell J, Leslie S, Ng VL, Gottfried EL. 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.
21. 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.
22. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence of citrate concentration. Am J Clin Pathol 1998; 109:595-9.
23. 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.
24. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Influence of two different buffered sodium citrate concentrations on coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2005; 16:381-3.
25. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Vermylen J, Cerletti C, de Gaetano G. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review. Thromb Haemost 2008; 99:14-26.
26. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Influence of primary sample mixing on routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2007; 18:709-11.
27. Dyszkiewicz-Korpanty A, Quinton R, Yassine J, Sarde R. The effect of a pneumatic tube transport system on PFA-100 trade mark closure time and whole blood platelet aggregation. J Thromb Haemost 2004; 2:354-8.
28. Wallin O, Söderberg J, Grankvist K, Jonsson PA, Hultdin J. Preanalytical effects of pneumatic tube transport on routine haematology, coagulation parameters, platelet function and global coagulation. Clin Chem Lab Med 2008; 46:1443-9.
29. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Manzato F, Guidi GC. Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2007; 18:525-8.
30. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Influence of centrifuge temperature on routine coagulation testing. Clin Chem 2006; 52:537-8.
31. Lippi G, Salvagno GL, Bassi A, Montagnana M, Poli G, Guidi GC. Dishomogeneous separation of citrated plasma in primary collection tubes for routine coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2008; 19:330-2.
32. Favaloro EJ, Mohammed A, Coombs R, Mehrabani PA. Filtered plasma as a potential cause of clinical misdiagnosis: Inappropriate testing in a haematology laboratory. Br J Biomed Sci 1995; 52:243-8.
33. Favaloro EJ, Facey D, Grispo L. Laboratory assessment of von Willebrand Factor: Use of different assays can influence the diagnosis of von Willebrand's Disease, depending on differing sensitivity to sample preparation and differential recognition of high molecular weight VWF forms. Am J Clin Pathol 1995; 104:264-71.
34. Adcock D, Kressin D, Marlar RA. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. Blood Coagul Fibrinolysis 1998; 9:463-70.
35. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. Int J Lab Hematol 2008 Mar 25 [Epub ahead of print].
36. Awad MA, Eldeen OA, Ibrahim HA. Stability of activated partial thromboplastin time (APTT) test under different storage conditions. Hematology 2006; 11:311-5.
37. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. Thromb Haemost 2008; 99:416-26.
38. Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. Am J Clin Pathol 2004; 122:686-92.
39. Rao LV, Okorodudu AO, Petersen JR, Elghetany MT. Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. Clin Chim Acta 2000; 300:13-21.
40. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood Coagul Fibrinolysis 2001; 12:229-36.
41. Alesci S, Borggrefe M, Dempfle CE. Effect of freezing method and storage at -20 degrees C and -70 degrees C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. Thromb Res 2009 Jan 5 [Epub ahead of print].
42. Favaloro EJ, Mehrabani PA. Laboratory assessment of von Willebrand factor: differential influence of prolonged ambient temperature specimen storage on assay results. Haemophilia 1996; 2:218-23.
43. Favaloro EJ. Pre-analytical variables in coagulation testing. Blood Coag Fibrinolysis 2007; 18:86-9.
44. Favaloro EJ, Nair SC, Forsyth CJ. Collection and transport of samples for laboratory testing in von Willebrand's disease (VWD): Time for a reappraisal? Thromb Haemost 2001; 86:1589-90.
45. Böhm M, Täschner S, Kretzschmar E, Gerlach R, Favaloro EJ, Scharrer I. Cold storage of citrated whole blood induces drastic time- dependent losses in factor VIII and von Willebrand factor: Potential for misdiagnosis of haemophilia and von Willebrand's disease. Blood Coag Fibrinolysis 2006; 17:39-45.
46. Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J, Wheeler M, Low J, Aboud M, et al., on behalf of the RCPA QAP in Haematology. Multi-laboratory testing of thrombophilia: Current and past practice in Australasia as assessed through the Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance

Program in Haematology. Semin Thromb Hemost 2005; 31:49-58.
47. Favaloro EJ, Bonar R, Kershaw G, Sioufi J, Baker R, Hertzberg M, et al., on behalf of the RCPA QAP in Haematology. Reducing errors in identification of von Willebrand disease. The experience of the Royal college of Pathologists of Australasia Quality Assurance Program. Semin Thromb Hemost 2006; 32:505-13.
48. Plebani M, Sanzari MC, Zardo L. Quality control in coagulation testing. Semin Thromb Hemost 2008; 34:642-6.
49. Plebani M. Appropriateness in programs for continuous quality improvement in clinical laboratories. Clin Chim Acta 2003; 333:131-9.
50. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, et al. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med 2007; 45:728-36.
51. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, et al. Raccomandazioni per la rilevazione e gestione dei campioni non idonei nei laboratori clinici. RIMeL / IJLaM 2007; 3:124-34.
52. Lippi G, Caputo M, Banfi G, Buttarello M, Cerotti F, Daves M, et al. Raccomandazioni per il prelievo di sangue venoso. RIMeL / IJLaM 2008; 4:249-58.