



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

PROCEDURE PER IL LABORATORIO DI EMOSTASI: IMPORTANZA DELLE VARIABILI PREANALITICHE

A CURA DEL GRUPPO DI LAVORO QUALITÀ DEI LABORATORI DELL'AICE

Edizione Luglio 2023



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

PROCEDURE PER IL LABORATORIO DI EMOSTASI: IMPORTANZA DELLE VARIABILI PREANALITICHE

A CURA DEL GRUPPO DI LAVORO QUALITÀ DEI LABORATORI DELL'AICE

Edizione Luglio 2023

Presentazione

Con la pubblicazione di questo documento, AICE persegue uno dei suoi principali obiettivi statutari: fornire ai soci e a tutti coloro che sono a vario titolo coinvolti nella gestione dei pazienti con emofilia e altre malattie emorragiche congenite, documenti su argomenti di natura pratica, che impattano sul trattamento e sul monitoraggio di laboratorio.

Molte delle variabili preanalitiche e i loro effetti sui test di emostasi, sono ovvie e note agli operatori di laboratorio, ma assai meno agli infermieri, che eseguono il prelievo di sangue e lo custodiscono fino al trasferimento in laboratorio, agli operatori addetti al trasporto e ai clinici che richiedono i test e fruiscono del risultato.

L'auspicio è che le indicazioni contenute in questo documento vengano diffuse a tutti gli operatori coinvolti e puntualmente seguite, in maniera da evitare che si verifichino errori preanalitici che possano inficiare l'attendibilità dei test di emostasi, determinando errori diagnostici e nel corso del monitoraggio del trattamento, che influenzerebbero in maniera considerevole la gestione ottimale dei pazienti.



Armando Tripodi

Presidente del Comitato Scientifico AICE

Sviluppo e cronologia del documento

La realizzazione di questo documento è stata proposta dal Gruppo di Lavoro (GdL) Qualità dei Laboratori dell'AICE, presieduto da Angiola Rocino, Presidente AICE, coordinato da Angelo Claudio Molinari e Rita Carlotta Santoro. Nella fase di definizione e prima elaborazione del documento (2021-2022), erano membri del GdL: Laura Contino, Raimondo De Cristofaro, Augusto B. Federici, Tiziano Martini, Sophie Testa, Armando Tripodi e Alessandra Valpreda. Dal gennaio 2023, a seguito della riorganizzazione dei GdL AICE, si sono aggiunti Alberto Catalano, Marina Marchetti, Ilaria Quaglia e Rossana Rossi.

La stesura del documento è stata curata da Alessandra Valpreda, con la collaborazione di Armando Tripodi. Nella fase di revisione, che ha portato a quattro successive versioni, il documento è stato sottoposto ai membri del GdL, con proposte di revisione da parte di Laura Contino e Marina Marchetti, e successiva approvazione unanime. La versione finale è stata quindi approvata dal Consiglio Direttivo AICE (Presidente: A. Rocino; Vice-Presidente: R.C. Santoro; Consiglieri: A.C. Molinari, C. Santoro, E. Zanon; Rappresentante ISS: F. Abbonizio) e dal Comitato Scientifico AICE (Presidente: A. Tripodi; Componenti: R. De Cristofaro, G. Di Minno, F. Peyvandi, M. Pinotti, P. Simioni) e pubblicata sul sito AICE in data 11.08.2023.

INDICE	Pagina
Introduzione	9
1. Richiesta dei test	9
2. Raccolta del campione	10
3. Trasporto del campione	12
4. Trattamento preliminare del campione	13
5. Conservazione fino all'esecuzione del test	14
6. Interferenze dovute a emolisi, ittero, lipemia	14
Conclusioni	15
Riferimenti bibliografici	15
Allegato 1	17

Introduzione

La diagnosi, la scelta dell'opzione terapeutica e il monitoraggio del trattamento delle emoflie e delle Malattie Emorragiche Congenite (MEC) devono essere supportati dai risultati di test di laboratorio, la cui accuratezza e precisione dipendono dalla corretta esecuzione di tutte le fasi delle procedure che, insieme, concorrono al risultato finale. Fra queste, rivestono particolare rilevanza le fasi preanalitica, analitica e post-analitica [1].

La fase preanalitica, in particolare, è molto critica ed è quella in cui si possono generare la maggior parte degli errori che compromettono l'affidabilità dei risultati [1,2].

Oggetto di questo documento è evidenziare l'importanza delle variabili preanalitiche dei test di emostasi e proporre le procedure più idonee, derivate dall'analisi della letteratura e dalla esperienza personale degli estensori, per evitare che eventuali errori non riconosciuti possano influenzare il risultato dei test e influire su una corretta diagnosi o sul monitoraggio della terapia di pazienti affetti da emofilia o altre MEC.

Si definiscono **variabili preanalitiche** i fattori di variabilità che intervengono durante la raccolta, preparazione, trasporto e conservazione del campione di sangue. Molte sono le condizioni e le variabili preanalitiche che possono alterare il risultato dei test; questa fase richiede, pertanto, estrema attenzione nei diversi momenti in cui si articola:

- 1) La richiesta dei test
- 2) la raccolta del campione di sangue
- 3) il trasporto al laboratorio
- 4) il trattamento preliminare del campione
- 5) la sua conservazione fino all'esecuzione dei test.

Molte di queste operazioni si svolgono al di fuori del controllo del laboratorio. Al fine di evitare che nella gestione della fase preanalitica si commettano errori non facilmente sospettabili, è quindi importante programmare un'adeguata informazione/formazione degli operatori coinvolti e, soprattutto, del personale infermieristico addetto all'esecuzione del prelievo [2,3].

1. Richiesta dei test

Il corretto iter diagnostico inizia dall'appropriatezza della richiesta, che si deve basare sulle informazioni clinico-anamnestiche e possibilmente prevedere anche l'esecuzione di test utili a eventuali diagnosi differenziali. La richiesta inoltrata al laboratorio deve, quindi, comprendere informazioni cliniche e circa il trattamento farmacologico che il paziente ha in corso o che sia stato attuato in precedenza. Questi dati sono utili al laboratorio per valutare la plausibilità dei risultati analitici, per sospettare un eventuale errore preanalitico, altrimenti non facilmente individuabile, e per valutare l'esecuzione di ulteriori test utili a una diagnosi differenziale.

Numerose sono le condizioni preanalitiche che possono modificare i test di emostasi:

- **Assunzione di farmaci, o contaminazione da farmaci** che possano influire sul sistema emostatico; l'assunzione di farmaci anticoagulanti è l'evenienza più frequente che può indurre alterazioni dei test di emostasi; non di rado, si può verificare che il campione sia contaminato da eparina, se prelevato in corso di procedure che utilizzano eparina (es.

cardiochirurgia o dialisi), o se il campione viene prelevato utilizzando un accesso da cateteri venosi permanenti;

- **Condizioni di stress o eccessivo traumatismo durante il prelievo** (es. bambini irrequieti, prelievi molto difficoltosi); in questi casi potrebbero verificarsi aumenti imprevedibili di alcune proteine dell'emostasi, fra cui il fattore VIII (FVIII) e il fattore di Willebrand (VWF), rilasciati dall'endotelio dei vasi traumatizzati;
- **Trattamento farmacologico mediante terapia sostitutiva e non-sostitutiva**; in questi casi è fondamentale che il laboratorio sia informato se il campione è stato raccolto prima o dopo infusione di concentrati di fattori della coagulazione, l'intervallo dall'ultima somministrazione, il tipo di concentrato utilizzato (per la scelta del metodo di monitoraggio più idoneo) e, eventualmente, se il trattamento è di natura non sostitutiva (emicizumab, altri farmaci non sostitutivi) [1].

2. Raccolta del campione [4]

La Tabella 1 riassume i principali errori preanalitici nella raccolta del campione e le relative conseguenze il cui significato deve, tuttavia, essere considerato con cautela in ragione del fatto che mancano studi appropriati per la loro valutazione. Al fine di evitare errori, si raccomanda di seguire scrupolosamente tutte le indicazioni sotto riportate [1].

- **Corretta identificazione del paziente** (nome, cognome, data di nascita) ed etichettatura delle provette; l'utilizzo di etichette dotate di codice a barre velocizza e rende più sicura l'identificazione;
- **Uso di provette in materiale inerte** non attivante la fase di contatto, quali propilene o vetro siliconato (sempre meno utilizzato per ragioni di sicurezza);
- **Prelievo da vena periferica mediante siringa**, utilizzando aghi di calibro 19-21 gauge (G), per evitare emolisi e/o attivazione delle piastrine;
- **Prelievo mediante aghi a farfalla e/o aghi di calibro minore (23 G) sono sconsigliati** e dovrebbero essere limitati a pazienti con reali difficoltà di accesso venoso [5]; in caso si utilizzino aghi a farfalla o altri cateteri venosi è bene scartare i primi millilitri di sangue [6];
- **Prelievo con minima stasi**, usando il laccio emostatico soltanto per il tempo necessario a individuare la vena e comunque per meno di un minuto;
- **L'anticoagulante di scelta è il citrato trisodico 0.109 M (3,2%)**, raccomandato dalle linee guida Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI); deroghe sono ammesse per la concentrazione 0.105 M; **concentrazioni più elevate (0.129 M (3,8%)), sono fortemente sconsigliate**;
- **Campioni raccolti in provette contenenti anticoagulanti diversi dal sodio citrato non sono idonei per i test di coagulazione**; tuttavia, l'uso di altri anticoagulanti può essere utile per alcune procedure, come l'indagine sulla funzione piastrinica e/o la fibrinolisi; provette contenenti EDTA, come anticoagulante, devono essere utilizzate solo per lo studio dei multimeri del fattore von Willebrand (VWF);

Tabella 1. Raccolta del campione: problemi preanalitici e implicazioni per la diagnosi di emofilia e VWD*

Possibile errore preanalitico		Possibile conseguenza	Significato	Azioni da intraprendere
ERRATA ESECUZIONE DEL PRELIEVO	Stasi eccessiva/uso protratto del laccio emostatico	Emoconcentrazione con possibile rilascio di fattori tissutali	Non studiato sistematicamente in emofilia e VWD; potrebbe indurre accorciamento dell'aPTT e attivazione di fattori, con eventuali valori falsamente elevati di FVIII e FIX	Assicurarsi che il prelievo sia eseguito secondo le raccomandazioni delle linee guida da personale ben addestrato
	Calibro dell'ago troppo piccolo	Rilascio di materiale tissutale; emolisi	Non studiato sistematicamente in emofilia e VWD; potrebbe indurre accorciamento dell'aPTT e attivazione di fattori, con eventuali valori falsamente elevati di FVIII e FIX	Assicurarsi che il prelievo sia eseguito secondo le raccomandazioni delle linee guida da personale ben addestrato
	Riempimento incompleto della provetta	Alterato rapporto anticoagulante/sangue, determinando un aumento di concentrazione del citrato e quindi anticoagulazione eccessiva	Possibile falsa riduzione dei livelli di FVIII, FIX, VWF; conseguente errata diagnosi di emofilia o della sua gravità	Assicurarsi che le provette siano correttamente riempite, fino al livello segnalato; addestramento del personale alla corretta esecuzione del prelievo
	Riempimento eccessivo della provetta	Inadeguata miscelazione con conseguente rischio di coagulazione parziale o completa del campione per diluizione finale dell'anticoagulante	Possibile falsa riduzione dei livelli di FVIII e FIX, qualora il campione fosse completamente coagulato, o falso aumento dei livelli, qualora il campione fosse parzialmente coagulato; conseguente possibile errore nella diagnosi di emofilia o della sua gravità	Assicurarsi che le provette siano riempite non oltre il livello segnalato; addestramento del personale alla corretta esecuzione del prelievo
ERRATA TIPOLOGIA DI PROVETTA (anticoagulante diverso da citrato trisodico)	Uso di provette contenenti EDTA come anticoagulante	Può mimare la presenza di un inibitore (aPTT prolungato, mancata correzione del test di miscela); eventuale falsa riduzione dei livelli di FV e FVIII e falso sospetto di presenza dei rispettivi inibitori	Possibile falsa diagnosi di emofilia A congenita con inibitore oppure di emofilia acquisita	Non utilizzare plasma in EDTA
	Uso di provette con litio-eparina come anticoagulante	Può mimare la presenza di un inibitore (aPTT prolungato, mancata correzione del test di miscela); eventuale falsa riduzione dei livelli di FVIII, FIX, FXI, FXII e falso sospetto di presenza dei rispettivi inibitori	Possibile falsa diagnosi di emofilia A congenita con inibitore oppure di emofilia acquisita	Non utilizzare plasma eparinato
	Uso di provette senza anticoagulante (siero)	aPTT non determinabile, corretto dal test di miscela; falsa riduzione dei livelli di FII, FV, FVIII, FIX, FXI, VWF (in particolare dei multimeri ad alto peso molecolare)	Falsa diagnosi di emofilia A/B o VWD	Non utilizzare siero; si può identificare l'erroneo invio di siero eseguendo la misura del fibrinogeno
ALTRE FONTI DI ERRORE	Campioni con ematocrito elevato	PT e aPTT potrebbero essere prolungati e i livelli di fattori ridotti (inclusi FVIII, FIX e VWF)	Falsa diagnosi di emofilia A/B o VWD	Eseguire la correzione del quantitativo di citrato se ematocrito >55%
	Errata identificazione del paziente o errata etichettatura delle provette	Risultati dei test erroneamente attribuiti a un paziente	Falsa o mancata diagnosi di emofilia o VWD	Accertarsi dell'identità del paziente; controllare la corretta etichettatura delle provette

*modificata da [13]; FVIII: Fattore VIII; FIX: Fattore IX; VWD: von Willebrand disease

- **Il corretto rapporto sangue-anticoagulante è 9:1** per valori di ematocrito compresi tra 30 e 50%; è importante che le provette siano riempite fino al livello segnalato sulle provette stesse; per le provette sottovuoto, il riempimento è determinato automaticamente dal vuoto che in esse è stato praticato; pertanto, l'operatore deve solo attendere che cessi completamente il flusso del sangue, prima di staccare la provetta; le criticità dei sistemi a vuoto possono essere rappresentate dalla pressione di riempimento e dai materiali utilizzati per le provette e per i tappi;
- **Immediatamente dopo il prelievo, invertire delicatamente le provette per almeno 3 volte** per assicurare una completa miscelazione tra sangue e anticoagulante; in caso di prelievi difficoltosi (bambini e neonati) può essere utile preparare siringhe da 1 mL contenenti 0,1 mL di citrato trisodico 0.109 M; le siringhe possono essere usate per il prelievo una di seguito all'altra, fino a quando il sangue scorre facilmente nel tubicino dell'ago a farfalla; quando il flusso si arresta, se una delle siringhe non è totalmente riempita, deve essere scartata, senza sprecare il sangue raccolto nelle precedenti; il contenuto delle siringhe correttamente riempite deve essere rapidamente trasferito in una provetta non attivante la fase di contatto e priva di anticoagulante e deve essere miscelato invertendo delicatamente la provetta per almeno 3 volte;
- È raccomandata la correzione del quantitativo di anticoagulante per campioni con ematocrito elevato (>55%); non esistono specifiche raccomandazioni per la correzione del volume dell'anticoagulante nel caso di ematocrito particolarmente basso; per la correzione della quantità di anticoagulante in rapporto all'ematocrito si possono, tuttavia, utilizzare nomogrammi grafici [1] o formule [7], come:

$$X = [(100 - HCT) / (595 - HCT)] \times \text{volume della provetta}$$

dove, X è il volume di anticoagulante richiesto.

3. Trasporto del campione [4]

Si raccomanda di seguire scrupolosamente tutte le indicazioni di seguito riportate [1].

Per distanze brevi (es. laboratorio di destinazione all'interno dell'ospedale o in ospedale vicino):

- dopo il prelievo le provette di sangue intero devono essere inviate al laboratorio nel minor tempo possibile [8];
- all'interno di contenitori per il trasporto, le provette devono essere tenute tappate, in posizione verticale e bloccate nell'alloggiamento per evitare eccessivi scuotimenti;
- la temperatura ambiente (15-22°C) è quella ideale per il trasporto in quanto temperature >25°C e <15°C possono determinare alterazioni [8];
- le provette devono essere centrifugate prima possibile e il plasma processato subito per i test di esecuzione giornaliera, o suddiviso in aliquote, congelato (possibilmente per immersione delle provette di stoccaggio in azoto liquido) e conservato a -70°C per i test differiti.

Per lunghe distanze (es. laboratorio lontano dalla sede di esecuzione del prelievo)

- le provette di sangue intero devono essere centrifugate e il plasma separato e congelato prima del trasporto, come precedentemente descritto;
- il trasporto deve avvenire in maniera da assicurare che il campione di plasma pervenga perfettamente congelato.

La Tabella 2 riporta le temperature e i tempi di conservazione più appropriati per il trasporto di campioni di sangue intero e plasma.

Tabella 2. Temperatura e tempo di conservazione del campione di sangue intero e di plasma*

TEST	SANGUE INTERO		PLASMA		
	Temperatura ambiente	Refrigerato	Temperatura ambiente	Refrigerato	Congelato -70°C
PT	Fino a 4 h	Non idoneo	Fino a 4 h	Non idoneo	Fino a 1 anno
APTT	Fino a 4 h	Non idoneo	Fino a 4 h	Non idoneo	Fino a 1 anno
FVIII/FV	Fino a 2 h	Non idoneo	Fino a 2 h	Fino a 2 h	Fino a 1 anno
Altri fattori	Fino a 4 h	Non idoneo	Fino a 4 h	Non idoneo	Fino a 1 anno

*Modificata da CLSI Guideline [4] e in base a dati della letteratura [14, 15]

4. Trattamento preliminare del campione [4]

Si raccomanda di seguire scrupolosamente tutte le indicazioni di seguito riportate [1].

Per campioni di sangue intero

- **Ispezione delle provette** per verificare la presenza di evidenti errori preanalitici che rendano il campione non idoneo e quindi da respingere a causa di: errata identificazione, presenza di coaguli, tipo di provetta e/o anticoagulante non idonei, evidente errato rapporto sangue/anticoagulante, errata conservazione durante il trasporto
- **Centrifugazione** delle provette tappate a 2.000 g per 15 minuti, a temperatura ambiente controllata (15°–22°C), per ottenere plasma povero di piastrine con conta piastrinica $<10 \times 10^9/L$
- **Arresto della centrifuga** preferibilmente senza uso di freno, per evitare la possibile contaminazione del plasma con piastrine e globuli rossi o utilizzando centrifughe con rotori dotati di supporti oscillanti, che minimizzano l'eventuale rimescolamento del materiale centrifugato
- **Evitare la filtrazione del plasma** con qualsiasi tipo di filtro nel tentativo di ridurre il numero di piastrine residue
- **Altre modalità di centrifugazione** (velocità e tempi differenti, doppia e/o refrigerata) possono essere più idonee per scopi particolari; ad esempio, per indagini di funzionalità piastrinica mediante aggregazione secondo Born è necessario recuperare plasma ricco di piastrine, centrifugando il campione a bassa velocità (200 g).

Per campioni di plasma che giungano in laboratorio congelati

- **Non si ha certezza sulla provetta di origine** e non è possibile controllare l'idoneità del campione; in teoria, potrebbe essere possibile riconoscere se la matrice originaria del campione è corretta [9] ma, di fatto, ciò è difficilmente realizzabile; **si raccomanda, pertanto, un'adeguata formazione del personale addetto al prelievo e degli operatori che si occupano del trasporto**
- **Campioni evidentemente mal conservati** (es. campioni congelati trasportati in contenitori che non garantiscono il mantenimento della temperatura di congelamento) **devono essere scartati**.

5. Conservazione fino all'esecuzione del test [4]

Dopo la centrifugazione è importante, innanzitutto, ispezionare il plasma per verificare la presenza di emolisi, ittero e lipemia. Si raccomanda di:

- **Procedere tempestivamente all'esecuzione dei test di routine giornaliera**
- **I campioni di plasma da utilizzare per l'esecuzione di test differiti, devono essere congelati al più presto, suddivisi in piccole aliquote, conservate in provette di materiale inerte con tappo**
- **Le aliquote devono essere congelate e conservate alla temperatura di almeno -70°C**; si raccomanda, ove possibile, un **congelamento rapido** mediante immersione delle provette tappate in azoto liquido per pochi secondi
- È importante anche il **corretto scongelamento del plasma, mediante immersione delle provette in bagno termostatico a 37°C per 3-5 minuti**; dopo lo scongelamento i plasmi devono essere **miscelati gentilmente** prima di eseguire il test [10].

6. Interferenze dovute a emolisi, ittero, lipemia

Plasmi emolizzati, itterici o lipemici rappresentano situazioni problematiche che si verificano frequentemente [11]. In particolare, l'emolisi può dar luogo ad attivazione della coagulazione con potenziali errori diagnostici per l'emofilia. In generale, tutte e tre le situazioni rappresentano un problema, in quanto interferiscono con i sistemi foto-ottici dei coagulometri. In presenza di campioni lipemici o itterici, l'uso di una strumentazione, con modalità di rilevazione del coagulo elettro-meccanica, permette di ottenere risultati non influenzati dalle caratteristiche fisiche del plasma in esame. È tuttavia utile rilevare che alcuni dei moderni coagulometri foto-ottici avvertono l'operatore sulla presenza di emolisi e dispongono di sistemi atti a compensare, entro certi limiti, il colore o la torbidità del plasma. Recenti studi hanno dimostrato che la bilirubina fino a livelli pari a circa 50 mg/dL non modifica in maniera clinicamente significativa PT e aPTT, anche se eseguiti con strumento foto-ottico, soprattutto se i risultati dei test sono espressi come ratio paziente/normale [12]. È raccomandata un'ispezione visiva delle provette, tenendo presente che la presenza di emolisi raramente è conseguenza di situazioni cliniche (es. anemia emolitica), ma quasi sempre dipende da errate manovre preanalitiche (emolisi spurie). Pertanto, spesso

la ripetizione del prelievo è sufficiente a risolvere il problema. Al contrario, la lipemia riflette, per lo più, reali situazioni cliniche e la ripetizione del prelievo non è utile.

Conclusioni

Le variabili preanalitiche, molto spesso scarsamente percepite e controllate, impattano in maniera significativa sui risultati dei test di emostasi. Molte delle variabili e i loro effetti sui test, descritti in questo documento, sono ovvie e note agli operatori di laboratorio, ma assai meno agli infermieri, che eseguono il prelievo e lo custodiscono fino al trasferimento in laboratorio, e ai clinici prescrittori dei test, che fruiscono del risultato.

Questo documento è stato redatto con particolare riguardo e attenzione a tutte le variabili che giocano un ruolo essenziale per la corretta gestione del paziente con emofilia e altre MEC, ma la lettura sarà certamente utile a tutti coloro che si occupano del paziente con disturbi dell'emostasi. L'auspicio è che le raccomandazioni formulate vengano seguite e diffuse a tutti gli operatori coinvolti, in maniera da evitare che si verifichino errori preanalitici che possono inficiare l'attendibilità dei test di emostasi, determinando errori di diagnosi e di monitoraggio terapeutico che influenzerebbero la gestione ottimale dei pazienti.

Riferimenti bibliografici

1. Favaloro EJ, Meijer P, Jennings I, et al. Problems and solutions in laboratory testing for hemophilia. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:819–33.
2. Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, Ten Cate H, Mullier F. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J* 2016;14:49.
3. Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D, et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:229-41.
4. Clinical and Laboratory Standard Institute. Collection transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular Hemostasis assays; Approved guideline, fifth ed. CLSI Document H21-A5. CLSI – Wayne, PA, 2008.
5. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:565–75.
6. Favaloro EJ, Lippi G, Raijmakers MT, Vader HL, van der Graaf F. Discard tubes are sometimes necessary when drawing samples for hemostasis. *Am J Clin Pathol* 2010;134:851.
7. 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.
8. Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:576–85.
9. 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* 2010; 32:132-8.
10. Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, Favaloro EJ, Lippi G. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: is any technique better than another? *Clin Biochem*

2016;49:1399-401.

11. Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:258-66.
12. Scalabrino E, Clerici M, Capecchi M, et al. Bilirubin color interference on prothrombin time and activated partial thromboplastin time assessed in patients with liver disease. *Clin Chem Lab Med* 2023 Jun 21. doi: 10.1515/cclm-2023-0393. Epub ahead of print.
13. Favaloro EJ, Lippi G. Preanalytical issues that may cause misdiagnosis in haemophilia and von Willebrand disease. *Haemophilia* 2018;24:198-210.
14. Feng L, Zhao Y, Zhao H, Shao Z. Effects of storage time and temperature on coagulation test and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014;4:3869.
15. Woodham B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coag Fibrinol* 2001;12:229-36.

Allegato 1

RAZIONALE PER LA CORRETTA ESECUZIONE DELLE PROCEDURE PREANALITICHE PER I TEST DI EMOSTASI

PRELIEVO

1. Quando il sangue fluisce nella provetta, che dovrebbe essere di lunghezza <6 cm, e viene a contatto con una superficie estranea si determina rischio di emolisi e attivazione della fase di contatto con possibile alterazione dei test di emostasi. L'utilizzo di provette in materiale inerte riduce il rischio.
2. In caso di prelievo utilizzando ago a farfalla, o altri cateteri venosi, e provette di raccolta sottovuoto, è consigliabile scartare alcuni mL di sangue per evitare che l'aria contenuta nel tubicino entri nella provetta con conseguente riempimento incompleto.
3. La stasi deve essere minima perché genera emoconcentrazione con possibile incremento dell'attività/concentrazione dei fattori della coagulazione e/o attivazione endoteliale con rilascio di materiale tissutale.
4. Anticoagulanti diversi dal sodio citrato non sono ammessi per i test di coagulazione, ad eccezione dei prelievi in EDTA per l'analisi dei multimeri del VWF. La concentrazione del sodio citrato usato come anticoagulante deve essere 0.109-0.105 M. Il sodio citrato esercita la sua azione anticoagulante in modo reversibile legando il calcio plasmatico e sottraendolo al processo della coagulazione. Una concentrazione di citrato più elevata porta a legare maggiori quantità di calcio, con conseguente prolungamento di PT e aPTT e alterazione di tutte le misure che su di essi si basano.
5. Un riempimento non corretto delle provette è causa di risultati errati. Il riempimento incompleto, a causa dell'eccesso di anticoagulante rispetto al plasma, genera eccessiva anticoagulazione con prolungamento dei tempi di coagulazione e sottostima dei livelli di fattori. Le conseguenze possono essere: errata diagnosi di emofilia e/o errata valutazione della sua gravità e/o sottostima dei livelli di fattore raggiunti dopo somministrazione di prodotti per la terapia sostitutiva. Il riempimento eccessivo impedisce, per mancanza di spazio residuo, un'adeguata miscelazione del campione e può causare, oltre a coagulazione del campione in vitro, accorciamento dei tempi di coagulazione con conseguente aumento dei livelli dei fattori.
6. È fondamentale miscelare correttamente il sangue con l'anticoagulante subito dopo il prelievo. Una miscelazione inadeguata può dar luogo alla formazione di coaguli, taluni di piccola entità, che sfuggono all'ispezione visiva. Una miscelazione troppo energica può generare emolisi e attivazione dei fattori. La mancata correzione della quantità di anticoagulante, per ematocrito elevato, induce una eccessiva anticoagulazione del plasma. In questo caso gli errori sui risultati dei test di coagulazione sono analoghi a quelli descritti per il riempimento incompleto.

TRASPORTO

1. Il trasporto del campione al laboratorio deve avvenire nel minor tempo possibile. Tempi eccessivamente lunghi compromettono la stabilità dei fattori più labili, fra cui FVIII e FV, con potenziali errori diagnostici.
2. Durante il trasporto le provette devono essere tappate. Provette non tappate, oltre a non rispettare le norme di sicurezza, espongono il campione a variazioni di pH con possibili modifiche di PT e aPTT.
3. Il trasporto deve avvenire a temperatura ambiente controllata (tra 25 e 15°C). Temperature più elevate inducono decadimento dei fattori più labili. La refrigerazione può attivare il FVII, in maniera incontrollata.

TRATTAMENTO PRELIMINARE E CONSERVAZIONE

1. La velocità di centrifugazione ottimale è di 2000 g. Velocità superiori potrebbero indurre emolisi e attivazione delle piastrine.
2. È molto importante che il plasma sia povero di piastrine. Infatti, nelle procedure di congelamento/scongelo del plasma, la presenza in eccesso di piastrine residue, oltre che essere inadeguata per i test di screening, può generare formazione di lisati cellulari/microvescicole che possono influenzare il risultato dei test e la misura dei fattori. Per alcuni test particolari (es., ricerca di anticoagulante lupico) è necessaria la doppia centrifugazione.
3. Fortemente sconsigliata la filtrazione per eliminare le piastrine residue. Causa la perdita di proteine ad alto peso molecolare (come il VWF) e può generare errori diagnostici nei test per la diagnosi di emofilia e VWD.
4. Importante conseguenza di un'errata conservazione del sangue/plasma è la perdita di attività dei fattori, con possibili errori nella diagnosi o gravità dell'emofilia.
5. Una delicata miscelazione dei plasmi dopo scongelamento si rende necessaria per omogeneizzare il plasma, perché durante il congelamento le proteine plasmatiche si stratificano.

