

Valutazione degli indici di emolisi, ittero e lipemia nei test di coagulazione

13/11/2018 – 12/02/2019

I test di diagnostica emocoagulativa rappresentano un momento essenziale per lo screening, la diagnosi, la terapia ed il monitoraggio dei disturbi emocoagulativi sia sul versante emorragico che trombotico. La qualità totale nella diagnostica in questo settore è un requisito necessario per il conseguimento di risultati clinicamente attendibili. Come in altri ambiti della diagnostica in vitro, i test emocoagulativi sono soggetti ad una variabilità legata prevalentemente alle procedure della fase preanalitica, quindi, i vari problemi che possono insorgere nella fase preanalitica possono incidere in modo determinante sulla qualità dei risultati. Il prelievo non idoneo per interferenze dovute alla presenza di bilirubina, lipemia ed emolisi rappresenta uno dei principali problemi preanalitici e quindi una delle maggiori cause di non conformità non solo in chimica clinica, immunometria ed ematologia ma anche in coagulazione.

L'emolisi è il risultato del rilascio di componenti intracellulari degli eritrociti, dei trombociti e dei leucociti nel liquido extracellulare. È visibile come colorazione rossa del plasma dopo centrifugazione del campione che corrisponde a concentrazioni di emoglobina libera superiori a 100-300 mg/L. Può essere definita come fattore interferente laddove interviene in vivo, mentre è una importante variabile preanalitica se si verifica durante o dopo la raccolta del campione. L'emolisi può influenzare significativamente i test coagulativi, per attivazione diretta dell'emostasi. Campioni con emolisi visibile devono essere quindi scartati e non refertati. Allo stesso modo dell'emolisi elevate concentrazioni di bilirubina e trigliceridi possono causare variazione significativa dei risultati sia dei test globali che specifici dell'emostasi.

In questi ultimi anni l'avvento dell'automazione ha consentito di far fronte ai cambiamenti organizzativi dei laboratori ed alla centralizzazione in laboratori "hub" di un elevato numero di esami provenienti da ospedali satelliti "spoke". Anche per i test di coagulazione, pertanto, così come già avvenuto per i test di chimica clinica ed immunometria, è emersa la necessità di potere eseguire in automazione la misura quantitativa di ittero, lipemia ed emolisi (HIL) modificando quindi attività che fino a pochissimi anni fa soprattutto in emostasi erano manuali, come l'ispezione visiva dei campioni per HIL prima del loro processamento.

Gli indici HIL sono basati su calcoli delle misurazioni dell'assorbanza dei campioni diluiti a lunghezze d'onda diverse.

Il range di misurazione del test HIL è compreso tra 5 e 100. I valori degli indici danno un'indicazione della presenza di interferenti endogeni, che possono influenzare il risultato dell'analisi. Valori degli indici HIL pari a 100 suggeriscono le seguenti concentrazioni approssimate di interferenti:

- Indice H 100: circa 1300 mg/dL di emoglobina
- Indice I 100: circa 66 mg/dL di bilirubina

- Indice L 100: circa 2000 mg/dL di lipidi

Obiettivo dello studio:

Questo studio ha lo scopo di valutare quanto emolisi, lipemia e ittero presenti nel campione possano interferire nel risultato finale dei test di coagulazione.

Materiali e metodi:

- Valutazione ITTERO:

Nello studio sono stati valutati 8 pool di 10 campioni l'uno. Da ognuno degli 8 pool abbiamo ottenuto 4 aliquote di plasma (ognuna di 2 ml) a cui sono state aggiunte concentrazioni crescenti di bilirubina (Bilirubina, Sigma, prodotto B4126- concentrazione 1500 mg/dL).

I1: no bilirubina

I2: 2 microlitri soluzione stock di bilirubina

I3: 20 microlitri soluzione stock di bilirubina

I4: 60 microlitri soluzione stock di bilirubina

- Valutazione LIPEMIA:

Nello studio sono stati valutati 8 pool di 10 campioni l'uno. Da ognuno degli 8 pool abbiamo ottenuto 5 aliquote di plasma (ognuna di 1.5 ml) a cui sono state aggiunte concentrazioni crescenti di trigliceridi esogeni (Lipofundin S 20%; Braun SpA Milano Italy - emulsione TG a media e lunga catena per nutrizione parenterale).

L1: no trigliceridi

L2: 2.5 microlitri soluzione stock di trigliceridi

L3: 5 microlitri soluzione stock di trigliceridi

L4: 10 microlitri soluzione stock di trigliceridi

L5: 30 microlitri soluzione stock di trigliceridi

- Valutazione EMOLISI IN VIVO:

Nello studio sono stati valutati 100 Pazienti afferenti al Pronto Soccorso con richiesta di esami di coagulazione. Degli stessi pazienti è stato processato anche il plasma non emolizzato di un secondo prelievo richiesto dal laboratorio secondo procedura interna (entro le due ore dall'effettuazione del primo prelievo).

- Valutazione EMOLISI INDOTTA:

Sono stati valutati 5 pool di 10 campioni l'uno. Da ognuno degli 5 pool abbiamo ottenuto 4 aliquote di plasma (ognuna di 2 ml) in cui è stata indotta emolisi mediante passaggio del sangue attraverso siringa da insulina (1, 3, 5 volte).

E1: no emoglobina

E2: 1 passaggio siringa

E3: 3 passaggi siringa

E4: 5 passaggi siringa

I campioni di plasma per l'esecuzione dello studio saranno ottenuti mediante prelievo venoso in provette tappo azzurro contenenti una soluzione di citrato di sodico 0.109 M nella proporzione sangue/anticoagulante 9:1 e saranno processati in accordo alle linee guida CLSI H03-A6 (Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture) e H21-A5 (Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular haemostasis assays).

In tutti i plasmi raccolti verranno valutati gli indici di Ittero/Emolisi/Lipemia sul coagulometro Cobas Roche e sullo strumento di Chimica Clinica C16000 Abbott e verranno eseguiti in doppio i test di primo livello PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina e DDimero.

I risultati di PT, PTT, fibrinogeno, antitrombina, D-Dimero e gli indici di emolisi, ittero e lipemia ottenuti verranno comparati mediante i test t-student e Bland Altman plot.

RISULTATI:

- VALUTAZIONE DELLA LIPEMIA:

Nella Tabella 1 sono riportati i valori di PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina, Ddimero negli 8 pool analizzati prima dell'induzione della lipemia.

POOL	PT sec	PT ratio	PTT sec	PTT ratio	AT%	Fibr mg/dL	DDimero ug/L FEU
1	8.08	0.94	28.90	0.91	90.80	465.00	3460.00
2	12.20	1.39	34.80	1.09	87.00	407.00	1190.00
3	21.30	2.43	49.80	1.56	94.70	384.00	326.00
4	32.20	3.68	53.90	1.68	96.40	362.00	624.00
5	8.58	0.98	32.30	1.01	85.90	408.00	870.00
6	9.78	1.12	37.80	1.18	81.50	464.00	4510.00
7	12.10	1.38	35.60	1.11	75.80	368.00	1750.00
8	31.30	3.58	46.40	1.45	96.40	339.00	458.00

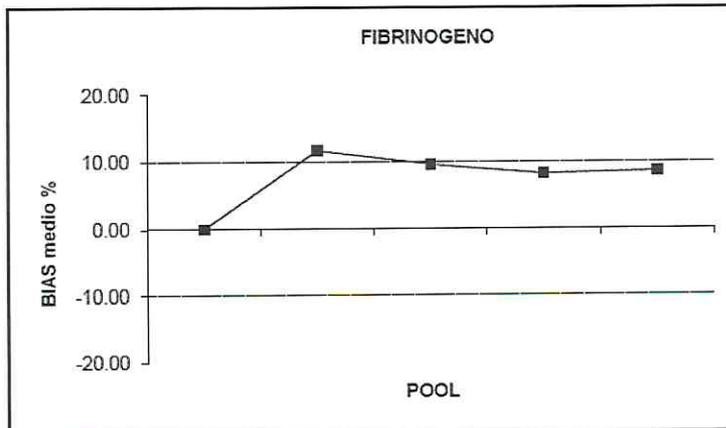
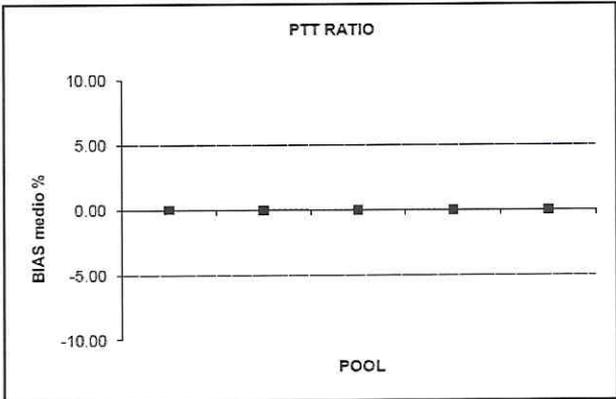
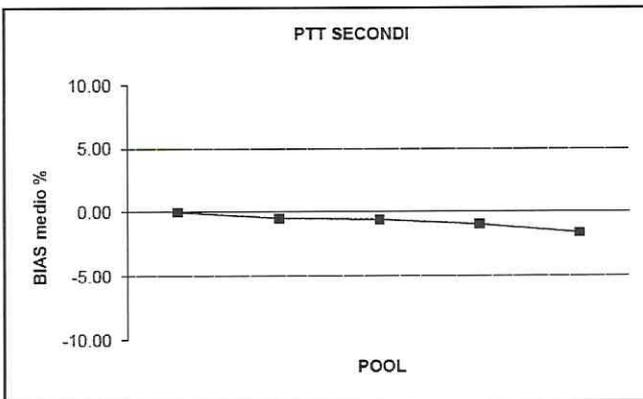
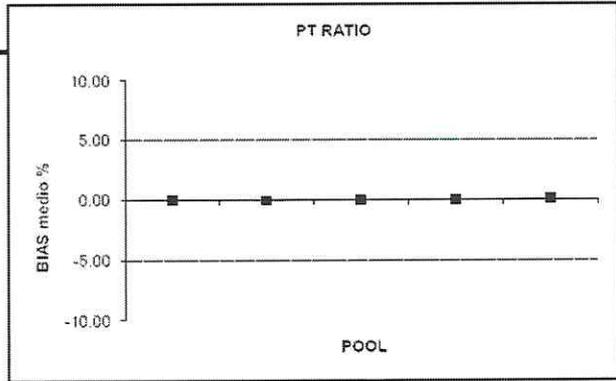
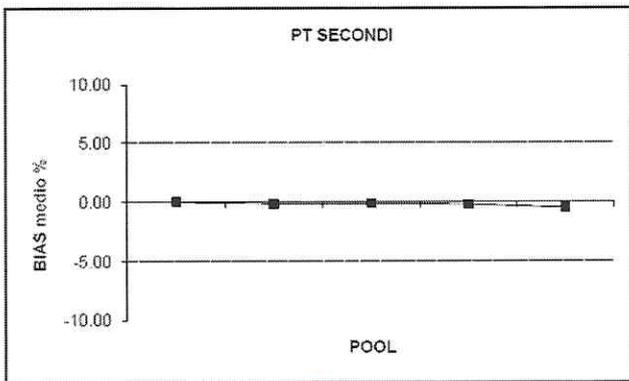
Tab. 1

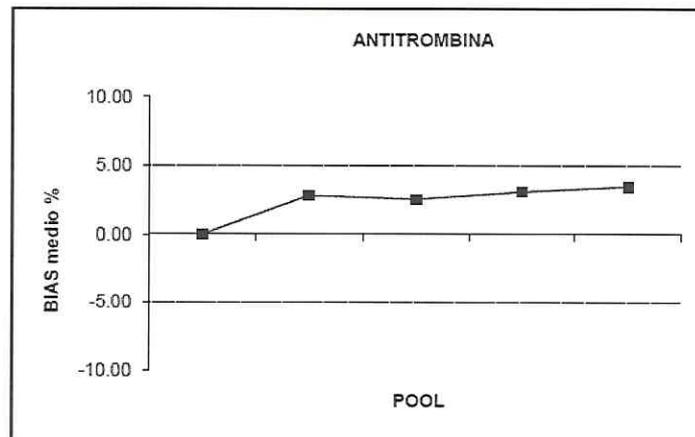
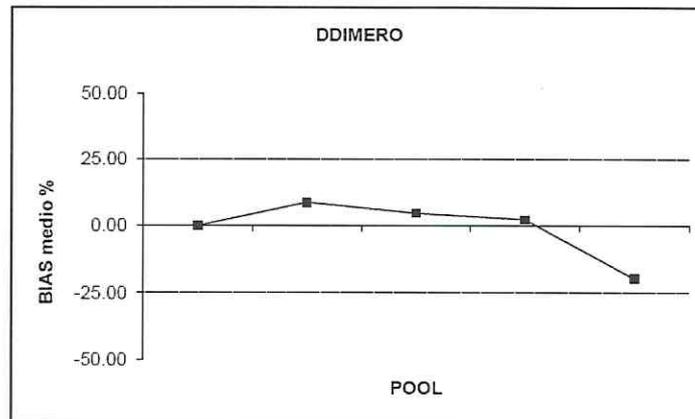
Sono stati comparati i risultati di PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina, Ddimero e degli indici HIL ottenuti nei campioni con concentrazioni crescenti di Trigliceridi esogeni con quelli ottenuti nel campione basale. I valori riportati nella Tabella 2 sono le medie dei valori ottenuti nei vari pool. I confronti sono stati eseguiti mediante utilizzo dei seguenti test statistici: t di Student, analisi di Bland Altman e mediante comparazione con l'errore totale massimo accettabile (Sibioc, Westgard).

	tc %	t1	t2	Bias %	p	t3	Bias %	p	t4	Bias %	p	t5	Bias %	p
Indice Cobas	0	5.7±1.7	-	<0.0001	6.6±1.7	-	<0.0001	10.7±1.9	-	<0.0001	23.2±2.1	-	<0.0001	
Trigliceridi	119.6±11.7	275.2±19.4	-	<0.0001	340.9±52.6	-	<0.0001	409.5±54.1	-	<0.0001	892.6±71.9	-	<0.0001	
PT sec	±5.3	16.0±9.5	16.7±9.5	-0.14	0.966	16.7±9.5	-0.12	0.972	16.6±9.5	-0.22	0.949	16.4±9.1	-0.40	0.884
PT ratio	±5.3	1.94±1.11	1.92±1.10	-0.06	0.965	1.92±1.10	-0.02	0.965	1.91±1.09	-0.09	0.949	1.88±1.05	0.06	0.886
APTT sec	±4.5	39.74±0.61	39.3±0.24	-0.47	0.874	39.2±0.2	-0.58	0.848	38.8±0.0	-0.96	0.746	38.1±7.3	-1.61	0.574
APTT ratio	±4.5	1.25±0.27	1.2±0.3	-0.01	0.882	1.23±0.25	-0.02	0.888	1.21±0.3	-0.04	0.693	1.20±0.2	-0.05	0.570
Fibrinogeno	±13.6	390.9±69.9	402.5±56.7	11.70	0.537	400.4±42.2	9.60	0.619	399.0±45.1	0.20	0.677	399.4±45.6	0.60	0.664
Antitrombina	±8.3	56.2±12.2	59.0±6.8	2.81	0.427	58.7±6.9	2.54	0.471	59.3±6.8	3.09	0.351	59.7±6.5	3.48	0.320
DDimero	±26.0	1627.6±1495.0	1636.3±1465.5	0.70	0.906	1632.4±1460.9	4.70	0.992	1629.9±1466.3	2.3	0.996	1607.9±1446.0	-19.70	0.305

Tab. 2

Prendendo in considerazione una ad una le analisi, dai grafici seguenti risulta evidente come, utilizzando il coagulometro Cobas, non c'è interferenza da lipemia su nessun analita a nessuna delle concentrazioni di trigliceridi esogeni testate.





- VALUTAZIONE ITTERO:

Nella Tabella 3 sono riportati i valori di PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina, Ddimero negli 8 pool analizzati prima dell'induzione dell'ittero.

POOL	PT sec	PT ratio	PTT sec	PTT ratio	AT%	Fibr mg/dL	Dim ug/L FEU
1	8.73	1.00	31.30	0.98	54.10	330.00	1410.00
2	9.14	1.05	43.90	1.37	47.40	341.00	1910.00
3	9.63	1.11	66.60	2.08	54.20	236.00	179.00
4	9.20	1.06	31.10	0.97	56.60	242.00	244.00
5	13.50	1.55	56.80	1.78	57.80	245.00	1690.00
6	8.78	1.01	30.80	0.96	52.20	354.00	1610.00
7	8.73	1.00	31.20	0.98	54.10	298.00	1760.00
8	31.50	3.62	44.00	1.38	47.70	305.00	1190.00

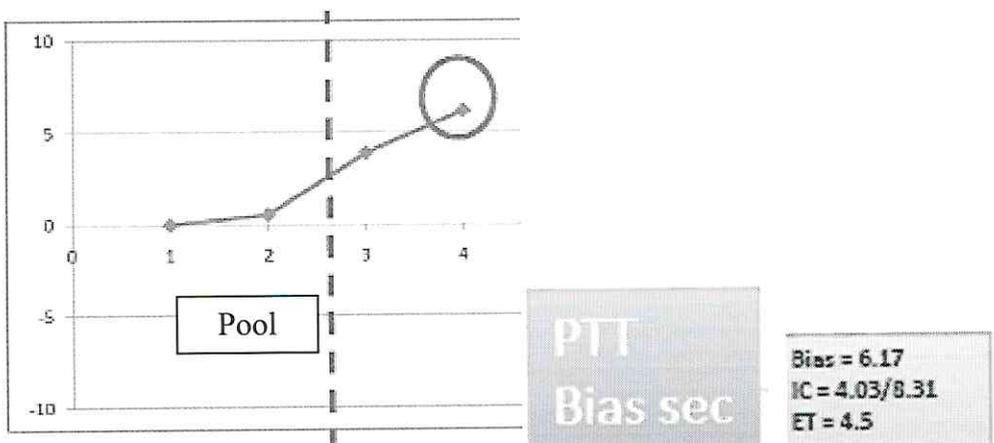
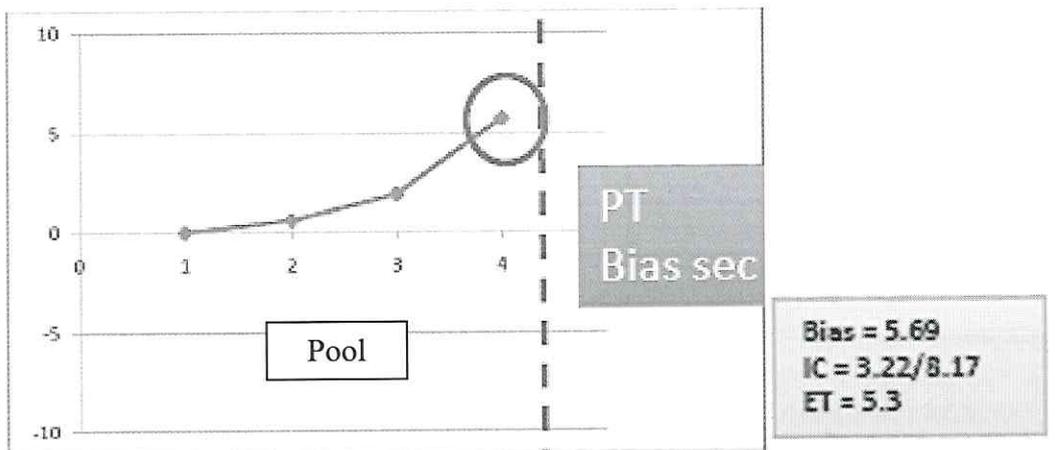
Tab. 3

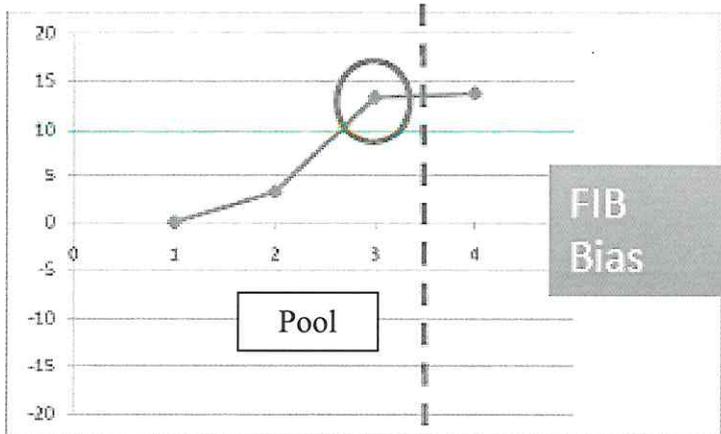
Sono stati comparati i risultati di PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina, Ddimero e degli indici HIL ottenuti nei campioni con concentrazioni crescenti di bilirubina con quelli ottenuti nel campione basale. I valori riportati nella Tabella 4 sono le medie dei valori ottenuti nei vari pool. I confronti sono stati eseguiti mediante utilizzo dei seguenti test statistici: t di Student, analisi di Bland Altman e mediante comparazione con l'errore totale massimo accettabile (Sibioc, Westgard).

	TE %	L1	L2	Bias % CI	p	L3	Bias % CI	p	L4	Bias % CI	p
Indice Cobas		0	8.00±0.76	-	<0.0001	11.36±1.30	-	<0.0001	37.6±12.3	-	<0.0001
Bilirubina mg/dL		0.24±0.12	3.6±0.37	-	<0.0001	9.71±0.96	-	<0.0001	29.2±1.97	-	<0.0001
PT sec	±5.3	12.4±7.88	12.9±8.08	0.59 0.31/0.86	0.889	14.3±8.08	1.92 1.58/2.26	0.673	18.1±10.77	5.69 3.22/8.17	0.247
PT ratio	-	1.43±0.91	1.49±0.93	0.07 0.03/0.09	0.884	1.63±0.94	0.21 0.15/0.26	0.661	2.06±1.24	0.37 0.37/0.93	0.241
APTT sec	±4.5	41.9±13.7	42.5±14.1	0.55 -0.33/1.93	0.938	45.9±14.3	3.90 1.53/6.28	0.586	48.1±12.4	6.17 4.03/8.31	0.361
APTT ratio	-	1.31±0.27	1.33±0.44	0.01 -0.02/0.06	0.937	1.43±0.45	0.12 0.04/0.19	0.585	1.90±0.39	0.19 0.12/0.26	0.360
Fibrinogeno	±13.6	293.8±47.3	297.1±57.2	3.25 -12.6/9.17	0.960	292.7±50.5	13.37 1.68/23.0	0.903	307.2±52.4	13.77 1.68/25.0	0.600
Antitrombina	±8.3	53.0±3.8	53.4±5.5	0.36 -3.45/4.18	0.879	54.5±5.01	1.55 -1.02/4.11	0.537	51.2±7.49	2.99 -2.79/8.25	0.496
DDimero	±28.0	1249.1±676.8	1249.6±679.8	0.5 -14.8/9.8	0.996	1267.7±701.2	18.8 -19.6/9.1	0.912	1310.6±715.6	38.6 -37.0/28.1	0.563

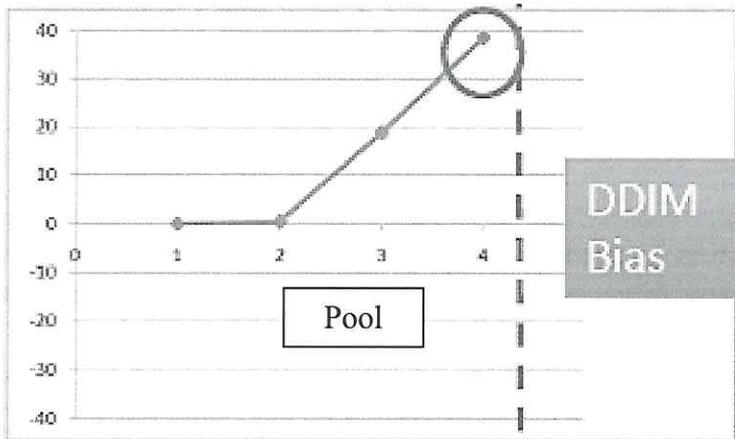
Tab. 4

Prendendo in considerazione una ad una le analisi, dai grafici seguenti risulta evidente come, utilizzando il coagulometro Cobas, abbiamo forte interferenza da bilirubina su tutti gli analiti, ad eccezione dell'antitrombina su cui l'interferenza è nettamente minore. Dalla letteratura sull'argomento si evidenzia che tale interferenza è presente anche su altri coagulometri (STA-R Evolution, CS-5100 e APL TOP 550).

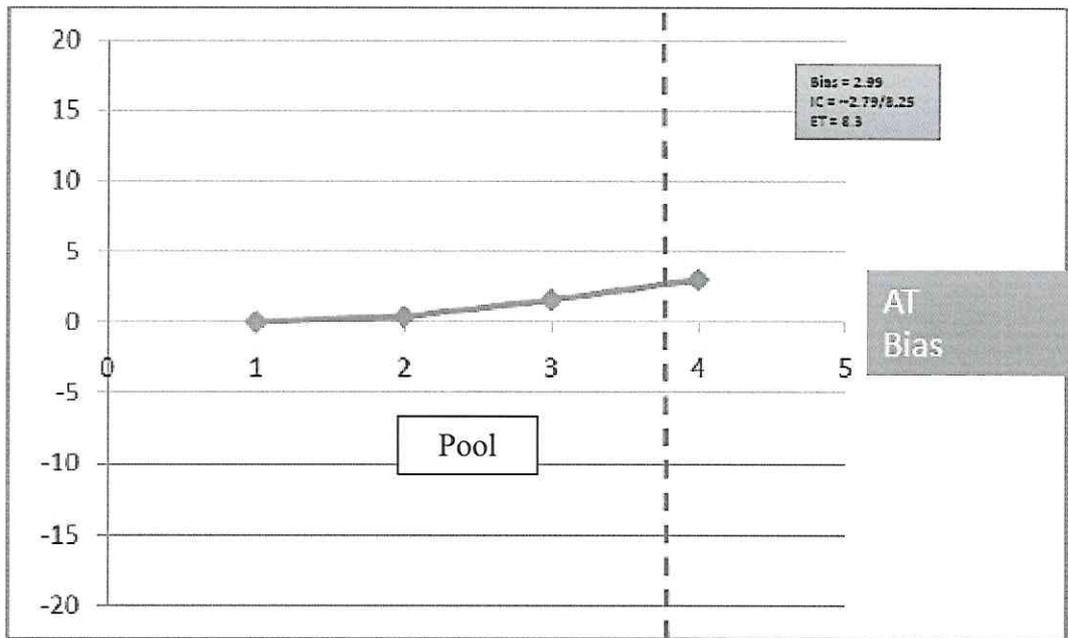




Bias = 13.37
 IC = 1.68/25
 ET = 13.6



Bias = 38.6
 IC = -37.0/26.1
 ET = 28



Bias = 2.99
 IC = -2.79/8.25
 ET = 8.3

- VALUTAZIONE EMOLISI INDOTTA:

Nella Tabella 5 sono riportati i valori di PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina, Ddimero nei 5 pool analizzati prima dell'induzione dell'emolisi.

POOL	PT sec	PT ratio	PTT sec	PTT ratio	AT%	Fibr mg/dL	Dim ug/L FEU
1	8.38	0.98	35.40	1.11	98.90	446.00	724.00
2	8.68	0.99	35.90	1.15	90.60	489.00	860.00
3	10.30	1.18	40.80	1.30	86.50	511.00	1620.00
4	22.00	2.55	52.90	1.66	98.00	323.00	122.00
5	29.20	3.42	59.80	1.88	92.80	357.00	979.00

Tab. 5

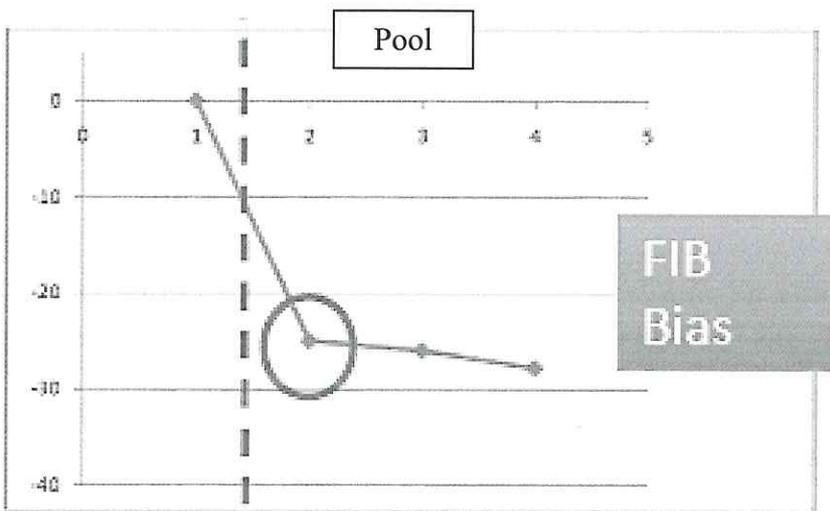
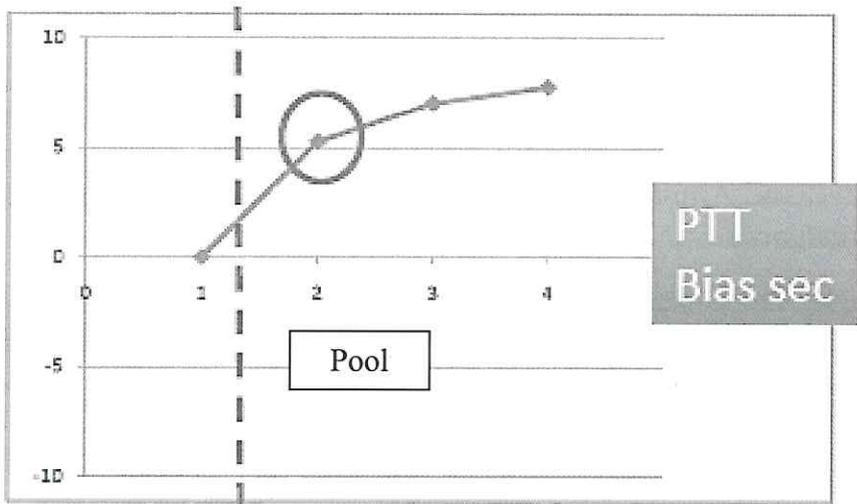
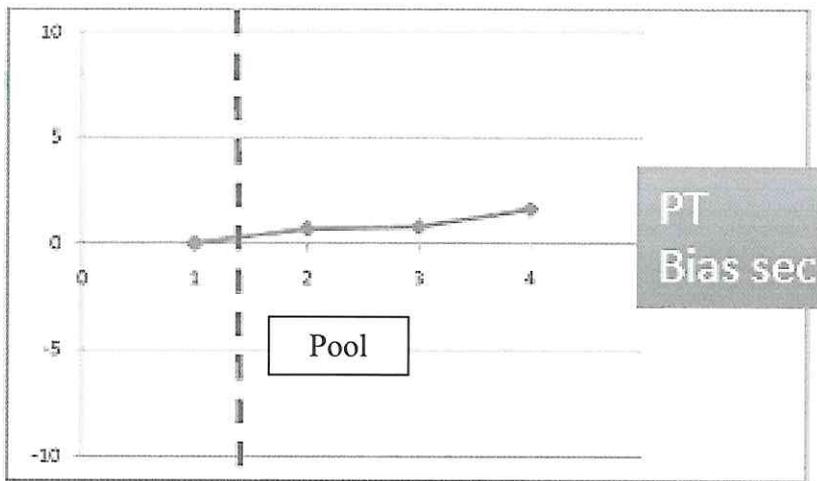
Sono stati comparati i risultati di PT, APTT, Fibrinogeno, Antitrombina, Ddimero e degli indici HIL ottenuti nei campioni con emolisi indotta in quantità crescente con quelli ottenuti nel campione basale. I valori riportati nella Tabella 6 sono le medie dei valori ottenuti nei vari pool. I confronti sono stati eseguiti mediante utilizzo dei seguenti test statistici: t di Student, analisi di Bland Altman e mediante comparazione con l'errore totale massimo accettabile (Sibioc, Westgard).

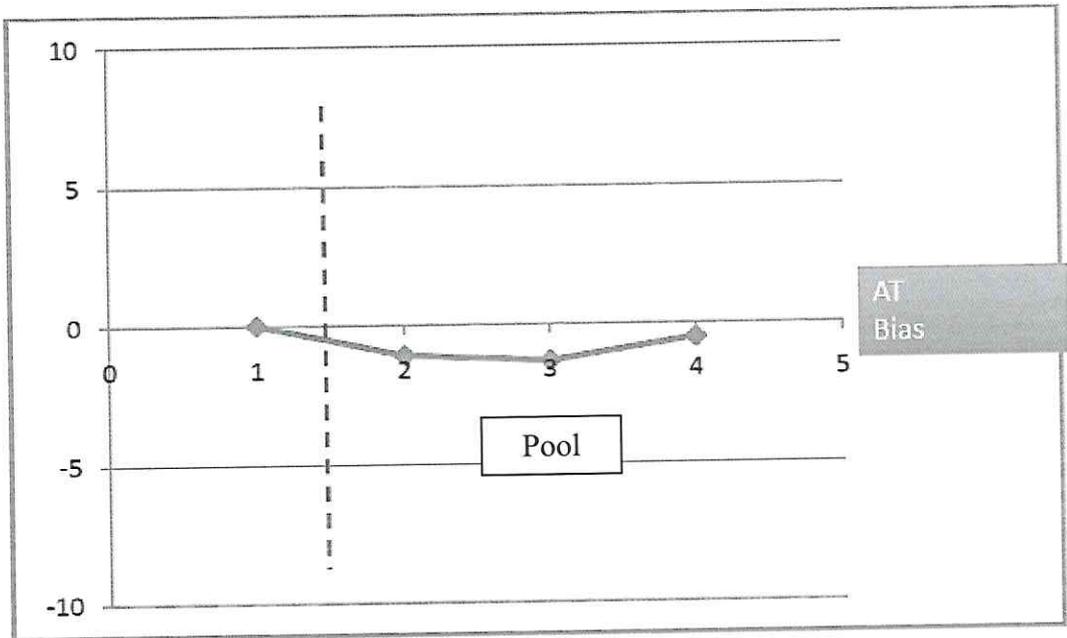
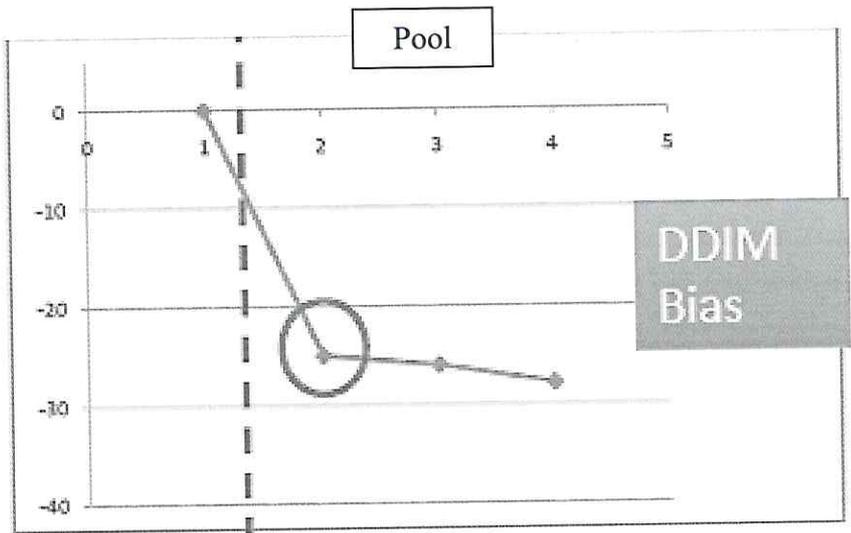
	TE %	L1	L2	Bias % CI	p	L3	Bias % CI	P	L4	Bias % CI	p
Indice Cobas		0	114.2±43.6	-	<0.0001	167.6±47.2	-	<0.0001	163.4±33.6	-	<0.0001
Emoglobina mg/dL		0.0±0.0	0.26±0.17	-	<0.0001	1649.8±362.2	-	<0.0001	2792.2±453.1	-	<0.0001
PT sec	±9.3	15.7±9.41	16.4±10.12	0.69 -0.42/1.81	0.913	17.3±11.52	0.79 -0.04/1.24	0.699	16.5±9.02	1.64 -1.22/4.20	0.510
PT ratio	-	1.02±1.11	1.05±1.13	0.02/0.07	0.972	1.93±1.23	-0.02/0.14	0.935	1.00±1.13	0.06 -0.05/0.26	0.393
APTT sec	±4.5	44.9±10.9	50.2±12.01	5.28 1.97/9.59	0.487	52.7±14.37	7.02 2.89/12.6	0.377	51.9±12.79	7.76 3.57/10.4	0.364
APTT ratio	-	1.42±0.34	1.59±0.39	0.17 0.17/0.24	0.479	1.63±0.44	0.18 0.08/0.27	0.416	1.60±0.40	0.21 0.07/0.24	0.233
Fibrinogeno	±13.6	425.2±62.10	411.6±79.8	-25.00 -33.6/16.3	0.797	292.7±50.5	-26.00 -30.6/28.0	0.651	397.4±69.28	-27.80 -43.3/-10.0	0.576
Antitrombina	±6.3	93.3±5.16	92.3±5.30	-1.1 -1.20/0.01	0.746	92.9±4.73	-1.32 -2.89/0.25	0.672	92.0±3.96	-0.52 -1.85/0.82	0.662
DDimero	±26.0	361.0±537.33	634.6±408.35	-25.2 -114.8/64.4	0.937	635.2±465.19	-25.2 -114.3/64.4	0.944	635.8±466.40	-22.8 -124.3/78.9	0.936

Tab. 6

Prendendo in considerazione una ad una le analisi, dai grafici seguenti risulta evidente come, utilizzando il coagulometro Cobas, l'emolisi indotta genera interferenza su tutti gli analiti ad eccezione del PT e dell'antitrombina.

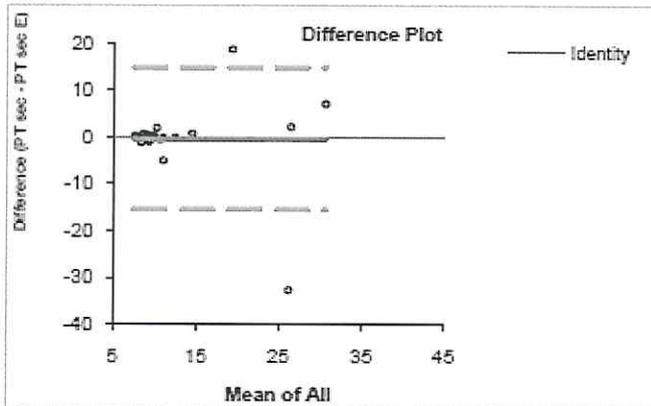
Dalla letteratura sull'argomento si evidenzia che tale interferenza è presente anche su altri coagulometri (STA-R Evolution, CS-5100 e APL TOP 550).



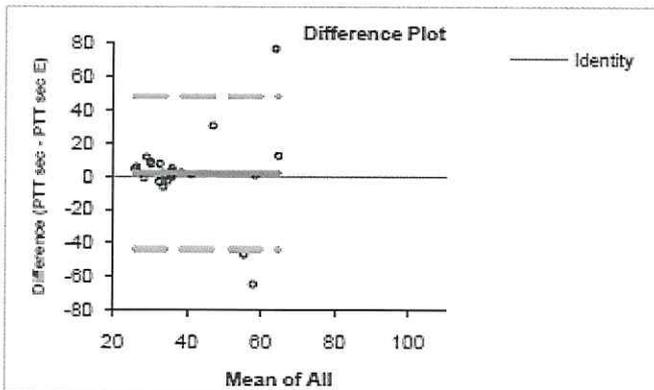


- VALUTAZIONE EMOLISI IN VIVO:

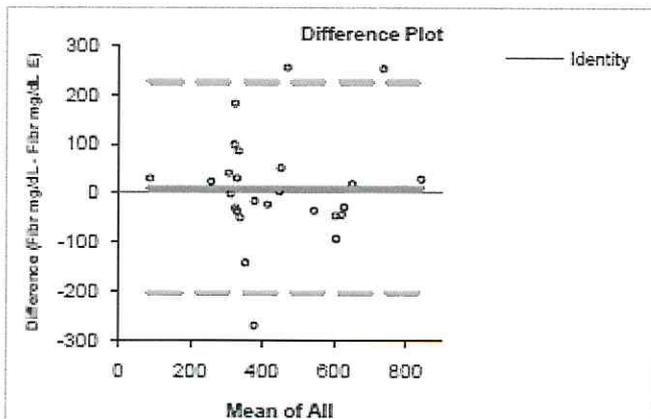
Abbiamo eseguito un confronto tra i valori di PT, APTT, Fibrinogeno, DDimero e Antitrobina in circa 100 campioni emolizzati arrivati dal Pronto Soccorso e nei campioni non emolizzati degli stessi pazienti richiesti dal Laboratorio secondo procedura interna. Il secondo prelievo è stato eseguito entro due ore dal primo prelievo. Si riportano di seguito i bias plot ottenuti per ciascun analita:



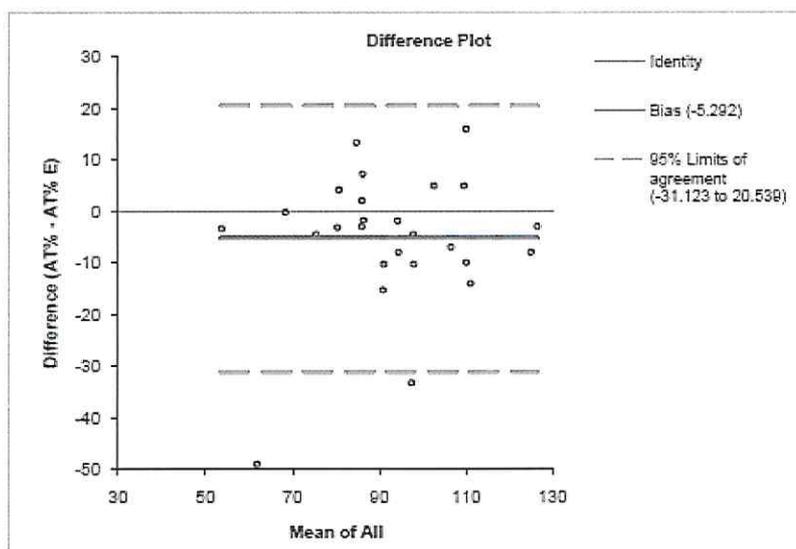
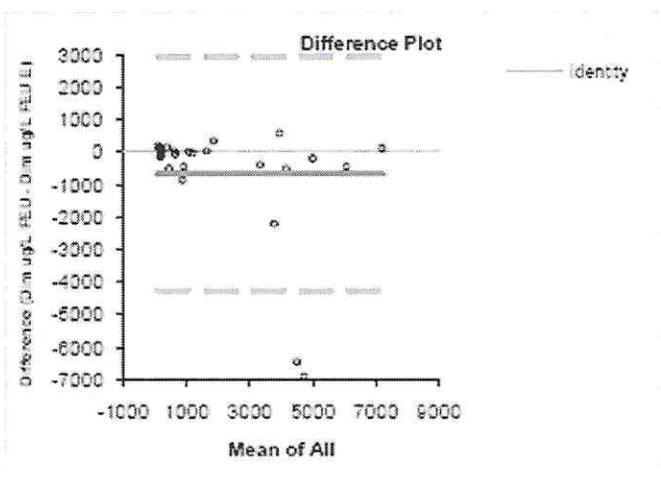
PT
Bias = -0.32
IC = -3.45/2.81
ET = 5.3



PTT
Bias = 2.10
IC = -7.32/11.53
ET = 4.5



FIBR
Bias = 11.20
IC = -32.9/55.3
ET = 13.6



Dai risultati ottenuti risulta evidente che il PT risente meno dell'interferenza da emolisi rispetto ai restanti analiti. Si suggerisce pertanto una soglia di emoglobina nel campione di 500 mg/dl per il PT e di 150 mg/dl per APTT, Fibrinogeno, DDimero e Antitrombina.

CONCLUSIONI:

I risultati ottenuti nel presente lavoro ci hanno permesso di confermare che, utilizzando i più moderni coagulometri, non vi è interferenza da lipemia nei test di coagulazione, mentre l'interferenza nei campioni itterici permane per quasi tutti gli analiti.

Per quanto riguarda l'emolisi vi sono differenze tra emolisi indotta e emolisi in vivo. L'emolisi indotta genera interferenze su quasi tutti gli analiti; l'emolisi in vivo genera meno interferenza, tuttavia è bene tenere conto dei valori soglia di accettabilità di emoglobina per ciascun analita nei campioni che arrivano in laboratorio emolizzati.

Il responsabile Scientifico del Progetto di Ricerca
Dr. Marco MIGLIARDI



Il prestatore d'opera
Dr.ssa Cristina GUIOTTO

