

Proposta di un protocollo per la gestione degli approfondimenti in ambito coagulativo nel percorso preoperatorio

Sonia Luzi, Lucia De Valentin, Roberta Turrini, Lavinia Dumitrescu, Serena Bonaguro, Lorena Zardo
Laboratorio Analisi - Ospedale S. Giacomo, Castelfranco Veneto (Treviso) – ULSS2 Marca Trevigiana

ABSTRACT

Proposal for a protocol aimed to investigate the alterations of the coagulation tests in patients undergoing surgical procedures.

A hemostatic assessment is usually included in the evaluation of patients undergoing surgical procedures. The aim of this work is to present a protocol shared with the Intensive Care, Hematology and Clinical Laboratory Units of the San Giacomo Hospital (Castelfranco Veneto, Treviso, Italy) to investigate the causes of the prolonged coagulation tests in these patients. In case of altered coagulation screening tests, a form is filled in with the pertinent anamnestic information and sent to the laboratory together with an adequate amount of blood. Following a pre-defined algorithm, the clinical laboratory performs the second level tests. The most relevant one for the purpose is the mixing test that permits an easy identification of the appropriate subsequent tests. The results of these tests allow clinicians to take the appropriate decisions. In case of a negative bleeding anamnesis, and/or in presence of a factor XII deficiency or a lupus anticoagulant positive test, the patient undergoes the surgical intervention; in other cases, the hematologist carefully evaluates the hemorrhagic risk of the specific patient.

In 2017, the protocol was applied to 37 cases of prolonged PT/APTT. In 8% of the patients the alteration was not confirmed, in 11% of cases the investigations could not identify the cause of the alterations. In the remaining 81% of cases, the identification of the specific coagulative defect was possible.

The application of this protocol can achieve a number of benefits: it reduces the number of accesses to the hospital for the patients, only the appropriate tests are performed on the basis of reflex testing procedures, the clinician is provided with all the relevant tests at one time with no need to request the tests one after another. The value of the mixing test in this clinical scenario is confirmed.

INTRODUZIONE

La valutazione del rischio emorragico individuale prima di un intervento chirurgico include di norma la determinazione del tempo di protrombina (PT), del tempo di tromboplastina parziale attivato (APTT) e il conteggio delle piastrine. La determinazione dell'APTT consente di individuare le anomalie della via intrinseca, mentre quella del PT verifica la presenza di alterazioni della via estrinseca; entrambi gli esami consentono di indagare la via comune. La suddivisione della cascata della coagulazione nelle vie intrinseca, estrinseca e comune ha una scarsa validità in vivo, ma rappresenta un'utile categorizzazione concettuale per interpretare i risultati delle indagini di laboratorio. Il riscontro di un

allungamento non noto in precedenza del PT e/o dell'APTT in fase preoperatoria, impone di indagare se il paziente abbia o meno un rischio emorragico (1-3). L'attivazione del percorso di approfondimento, spesso molto articolato, include il richiamo del paziente, ulteriori esami di laboratorio e visite specialistiche che possono portare ad un allungamento dei tempi di attesa, ritardando l'intervento e aumentando lo stress per il paziente e per i familiari. I tempi per indagare in laboratorio il rischio emorragico del paziente possono allungarsi anche in seguito a richieste incomplete o non appropriate di esami specialistici di coagulazione.

In realtà, lo studio delle alterazioni di PT e APTT può essere semplificato se viene seguito uno schema ordinato di valutazione e se il percorso viene gestito da

Corrispondenza a: Sonia Luzi, Via dei Carpani 16/z, 31033 Castelfranco Veneto (TV), Tel 3393020356, E-mail sonia.luzi@aulss2.veneto.it

Ricevuto: 24.09.2019

Revisionato: 25.11.2019

Accettato: 13.12.2019

Pubblicato on-line: 06.03.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.013

personale esperto.

A tal proposito, all'interno dell'Ospedale S. Giacomo di Castelfranco Veneto (Treviso), è stato messo a punto un protocollo di gestione dello screening preoperatorio degli esami di coagulazione all'interno del quale il personale specialista del Laboratorio Analisi e i Clinici di riferimento (anestesista ed ematologo) gestiscono in maniera concordata il percorso diagnostico e clinico del paziente. Questo percorso consente di ridurre il numero di accessi del paziente, di ottimizzare le risorse e di evitare l'esecuzione di esami inutili. Scopo di questo lavoro è la descrizione e presentazione del protocollo.

DESCRIZIONE DEL PROTOCOLLO

Il protocollo concordato prevede che il paziente venga richiamato per confermare i risultati ottenuti al primo riscontro, per escludere interferenze e/o errori preanalitici e per proseguire (se è il caso) con accertamenti ulteriori. Il reparto preleva in un'unica seduta tre campioni in sodio citrato che assicurano un volume necessario di sangue per gestire tutti gli eventuali approfondimenti e compila una scheda anamnestica del paziente contenente l'indicazione dell'anagrafica, i valori del primo riscontro degli esami coagulativi di base, eventuali terapie anticoagulanti in corso, riferiti episodi emorragici e/o patologie coagulative note (Figura 1). Il materiale raccolto presso l'Unità Operativa di Preospedalizzazione viene recapitato al laboratorio analisi con il primo trasporto utile e comunque entro 4 ore dal prelievo (4). Il laboratorio, prima di attivare il percorso diagnostico, esclude la presenza di interferenti e/o anticoagulanti attraverso la valutazione della scheda anamnestica, in quanto la presenza nel campione di anticoagulanti può alterare i risultati degli esami di laboratorio. I campioni sono presi in carico e processati iniziando dalla determinazione degli esami di base per confermare o meno la prima anomalia riscontrata. Se i valori di PT e/o APTT risultano all'interno dell'intervallo di riferimento, il percorso diagnostico viene concluso e il reparto procede con la programmazione dell'intervento, in quanto, con grande probabilità, l'alterazione era dovuta ad una problematica preanalitica. Al contrario, se i valori di PT e/o APTT si mantengono allungati, si procede con l'esecuzione del test di miscela con uno dei campioni raccolti; gli altri campioni vengono direttamente centrifugati [l'aliquota per il lupus anticoagulant (LAC) viene centrifugata due volte] e conservati a -20°C per ulteriori eventuali approfondimenti (5). Il test di miscela è il punto cardine del percorso per decidere gli esami di approfondimento e permette di orientare lo specialista verso lo studio di difetti fattoriali o di inibitori.

Il test di miscela

Questo test consiste nel miscelare il plasma del paziente con un'uguale quantità di un pool di plasma normale (NPP) per poi rieseguire l'esame di base (PT o APTT) e valutare se è avvenuta o meno la correzione

dell'alterazione presente nel plasma paziente. L'aggiunta del pool normale introduce una quantità di fattori (circa il 50%) che dovrebbe essere sufficiente a correggere i valori di PT e APTT. La capacità o meno della miscela di correggere i tempi di coagulazione può essere valutata attraverso diverse modalità quali formule o valori di riferimento. La modalità utilizzata è il calcolo dell'indice di Rosner (Index of Circulating Anticoagulant, ICA), valore ottenuto da una formula che rapporta la differenza fra il tempo della miscela e del NPP, al tempo del paziente

$$[(Tempo\ miscela\ 1:1 - Tempo\ NPP)/Tempo\ paziente] \times 100$$

Se l'indice ottenuto è <10% si assume che il pool aggiunto sia sufficiente a correggere la miscela, se >15% si assume che non corregga, se nell'intervallo 10-15%, il risultato del test viene considerato dubbio e quindi non dirimente (6,7).

Il test di miscela viene eseguito al tempo zero e dopo incubazione a 37°C per 2 ore in bagno termostato per valutare la presenza di eventuali inibitori ad azione lenta e/o temperatura dipendenti.

Prima di eseguire un test di miscela è opportuno:

- escludere che l'allungamento del tempo di coagulazione sia legato all'effetto di una terapia anticoagulante;
- escludere la presenza di una diagnosi già nota che comporti l'allungamento del tempo del test di screening riscontrato;
- raccogliere le notizie clinico-anamnestiche del paziente.

Queste informazioni sono contenute nella scheda inviata al laboratorio.

La non correzione nella miscela al tempo zero o dopo incubazione è suggestiva della presenza di un inibitore specifico o aspecifico in quanto questo andrà ad inibire anche i fattori presenti nel NPP. Normalmente un inibitore aspecifico come il LAC non corregge l'APTT già nella miscela al tempo zero, mentre la maggior parte degli inibitori fattore-specifici agiscono lentamente e/o a temperature fisiologiche quindi la loro attività si manifesta solo nel test di miscela eseguito dopo incubazione e termostatazione (8,9). Se la miscela corregge sia prima che dopo incubazione, questo è suggestivo del difetto di un fattore in quanto l'aggiunta dei fattori contenuti nel NPP sopperisce al difetto di fattore presente nel plasma paziente (10,11).

L'algoritmo applicato in relazione all'esito del test di miscela, con l'aggiunta dei test di approfondimento appropriati, è descritto in Figura 2. In presenza del solo PT allungato, con test di miscela che corregge, si procede con la determinazione dei fattori della via estrinseca/comune (FVII, FII, FV, FX) la cui carenza è evidenziata dal test del PT. Analogamente, in presenza del solo APTT allungato, con test di miscela che corregge prima e dopo incubazione, si procede con la determinazione dei fattori della via intrinseca (FVIII, FIX, FXI, FXII) e del fattore di von Willebrand, la cui carenza

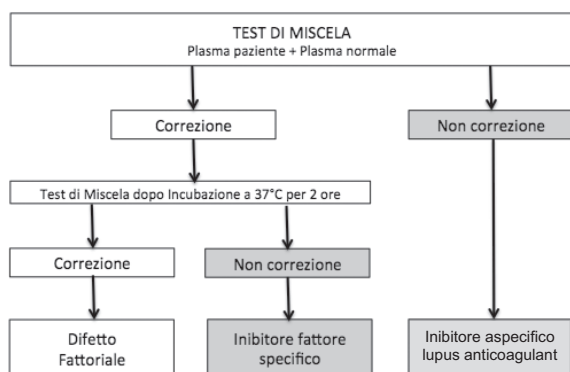


Figura 2
Algoritmo per l'interpretazione del test di miscela

può essere evidenziata dal test dell'APTT. Un APTT allungato, con test di miscela che non corregge al tempo zero, suggerisce la presenza di inibitori aspecifici (non tempo/temperatura dipendenti), e fa attivare la procedura di ricerca del LAC (12-15). Un APTT allungato, con test di miscela che corregge nel test di miscela al tempo zero e non corregge dopo incubazione, suggerisce la presenza di inibitori specifici tempo/temperatura dipendenti, e fa attivare la determinazione dei fattori della via intrinseca per individuare il fattore inibito e successivamente determinare l'inibitore fornendo il risultato in Unità Bethesda (16,17).

A fronte di un allungamento sia di PT che di APTT, con test di miscela che corregge entrambi gli esami, si procede con la determinazione dei fattori della via estrinseca/comune (FVII, FII, FV, FX) per l'individuazione del fattore carente.

Potrebbe tuttavia coesistere più di una anomalia ed essere presenti interferenti che rompono il perfetto schema sopra riportato, pertanto lo specialista di laboratorio ed il clinico devono sempre essere in contatto continuo perché molto spesso la clinica del paziente indirizza già verso un sospetto diagnostico.

ESPERIENZA PRELIMINARE

Il protocollo concordato con l'Unità Operativa di Preospedalizzazione, è stato applicato a 37 pazienti in attesa di intervento chirurgico, provenienti dal reparto di Preospedalizzazione dell'ospedale di Montebelluna nel 2017, 19 femmine e 18 maschi dai 3 agli 82 anni, di cui 18 in età pediatrica (3-12 anni), 13 in età compresa fra 15 e 58 anni e 6 con età compresa fra 68 e 82 anni. I pazienti presentavano allungamenti di PT (intervallo: 1,29-1,47 ratio; v.r. 0,9-1,2) o APTT (intervallo: 1,24 - 2,33 ratio, v.r. 1,82-1,19) o, di entrambi i parametri (PT 1,33 ratio e APTT 1,22 ratio; un solo paziente). Gli esami sono stati eseguiti su strumentazione automatica della ditta Werfen, Barcellona, Spagna, (ACL TOP500 e ACL

TOP700), utilizzando reattivi della stessa ditta (18-21). Le prestazioni dei metodi impiegati rispondono ai requisiti di precisione ed accuratezza definiti dai programmi di Controllo di Qualità Interno ed Esterno a cui il laboratorio partecipa. Oltre alle determinazioni indicate, viene effettuato anche il test di miscela basato su determinazioni di PT/APTT (22) (vedi paragrafo dedicato).

Il pool di plasma normale utilizzato nel test di miscela viene preparato da plasmi di pazienti aventi gli esami di coagulazione di base all'interno dei valori di riferimento. Il pool viene conservato a -80°C in aliquote sufficienti per una seduta analitica (5).

I risultati ottenuti durante questa esperienza sono presentati in tabella 1. Nell'81% dei 37 pazienti studiati, applicando la metodologia descritta, si è riusciti ad individuare la causa della alterazione degli esami di base, potendo così indirizzare il paziente verso il percorso più adatto alla sua condizione clinica. In alcuni casi (8%) non c'è stata una conferma dell'allungamento, e non sono stati quindi necessari ulteriori approfondimenti; nel rimanente 11% dei casi non si è riusciti a trovare la causa dell'allungamento e la sola clinica ha orientato il percorso del paziente (Tabella 1).

CONSIDERAZIONI FINALI

La valutazione del rischio emorragico è inclusa nella valutazione dei pazienti che devono essere sottoposti ad intervento chirurgico. La disomogeneità degli interlocutori coinvolti nel processo (laboratorio clinico, ematologia, anestesia, area di emergenza) rende problematico un approccio standard a tale valutazione; per questo motivo la stesura di un protocollo condiviso e la compilazione di un modulo pure condiviso consente di avere sempre a disposizione le informazioni necessarie, facilitando il percorso.

Sul versante del laboratorio clinico, il test di miscela si è rivelato particolarmente importante per l'identificazione veloce delle cause delle anomalie degli esami di base. Questo test infatti è una procedura analitica che consente di identificare rapidamente il motivo di un allungamento non noto di uno o entrambi i test di screening (PT e APTT) in assenza di terapia anticoagulante (eparine, antagonisti della vitamina K o anticoagulanti ad azione diretta) o di una diagnosi precedente che lo motivi (positività al LAC, malattia di von Willebrand, emofilia, epatopatia) (23). Si assume che PT e APTT risultino normali quando siano presenti livelli di almeno il 50% dei fattori interessati. Con il test di miscela si va a valutare se la miscela 1:1 del campione in esame con un pool normale corregge l'alterazione del test di screening dal momento che un livello del 50% di un fattore è sufficiente a riportare nella norma il test alterato.

Il test di miscela è una procedura utilizzabile in situazioni di urgenza per dirimere la causa di un allungamento inatteso ed indirizzare il clinico nella valutazione del rischio emorragico del paziente ed è anche una procedura utilizzabile in routine per definire

Tabella 1
Tipologia e frequenza delle anomalie riscontrate

N pazienti	PT ratio	APTT ratio	Difetto riscontrato	%	
26	10	normale	1,25-1,42	FXII	27%
	1	normale	1,32	FIX	3%
	2	normale	1,27-1,50	VWF	5%
	9	normale	1,27-2,33	LAC	24%
	4	normale	1,24-1,39	nessuno	11%
7	1,29-1,47	normale	FVII	19%	
1	1,30	1,22	FV e FVII	3%	
3	normale	normale	esami di II livello, non eseguiti	8%	

PT, tempo di protrombina; APTT, tempo di tromboplastina parziale attivato; FXII, fattore XII; FIX, fattore IX; VWF, fattore di von Willebrand; LAC, lupus anticoagulant; FVII, fattore VII.

gli approfondimenti necessari allo studio della causa di un allungamento degli esami di base, ottimizzando tempi e risorse, effettuando i test in maniera appropriata.

L'interpretazione della correzione è un punto cruciale del test di miscela per la prosecuzione degli approfondimenti ma non sempre è facile da eseguire, richiede molta esperienza e flessibilità di applicazione delle diverse procedure esistenti (16)(6).

Una prima modalità interpretativa è di ritenere presente la correzione quando il risultato dell'APTT (e/o PT) della miscela rientra all'interno dei valori di riferimento prestabiliti; invece, quando il risultato dell'APTT (e/o PT) rimane al di fuori di limiti di riferimento, si parla di mancata correzione (non correzione). Una seconda modalità di interpretazione, invece, prevede un calcolo matematico impostato su formule, per esempio l'indice di Rosner utilizzato in questo lavoro.

In conclusione, l'applicazione del protocollo proposto consente la determinazione del difetto coagulativo nei pazienti che devono essere sottoposti ad interventi in elezione di chirurgia minore o maggiore con un percorso razionale che sfrutta le competenze delle Unità Operative coinvolte. Il Reparto di Anestesia e Rianimazione si occupa di coordinare i percorsi preoperatori individuando i pazienti potenzialmente a rischio emorragico; il Reparto di Ematologia esegue le consulenze sulla base dei risultati dei test coagulativi di primo e secondo livello e il Laboratorio Analisi, si occupa di gestire il percorso diagnostico, identificando gli esami più adeguati da eseguire. Inoltre questo percorso consente di prevedere meno accessi per il paziente, due o al massimo tre se la consulenza ematologica si rende

necessaria. Vengono raccolti in un'unica soluzione tutti i prelievi necessari per la conferma dell'alterazione e l'esecuzione dei test indispensabili alla definizione del difetto coagulativo. Questo è particolarmente importante nella gestione dei pazienti pediatrici nei quali la diminuzione dello stress legato agli accessi multipli (che arrivavano fino a 5 nel percorso preoperatorio tradizionale) migliora significativamente il benessere del bambino che deve sottoporsi all'intervento e dei suoi familiari.

Di tutte le anomalie riscontrate, il 30% erano degne di significato da un punto di vista di rischio emorragico mentre negli altri casi si è trattato o di presenza di LAC (con eventuale effetto trombotico) o di difetti, quali la carenza di FXII, che non causano sanguinamenti. La determinazione del tipo di difetto è utile all'ematologo per valutare il rischio emorragico e decidere se il paziente può direttamente sottoporsi all'intervento oppure se necessita di una visita ematologica più approfondita.

Infine, una corretta esecuzione degli approfondimenti, oltre ad escludere o confermare il rischio emorragico nella circostanza specifica, è utile per il paziente in quanto fornisce una documentazione della causa della anomalia degli esami di base che, in caso di future emergenze, evita allungamenti nei tempi di intervento consentendo azioni terapeutiche o chirurgiche immediate.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tagariello G, Radossi P, Castaman G, et al. Clinical relevance of isolated APTT prolongation in a cohort of adult patients undergoing surgical procedures. *Blood Transfus* 2011;15:557-61.
2. Tosetto A, Castaman G, Plug I, et al. Prospective evaluation of the clinical utility of quantitative bleeding severity assessment in patients referred for hemostatic evaluation. *J Thromb Haemost* 2011;9:1143-8.
3. Kershaw G, Orellana D. Mixing Tests: diagnostic aides in the investigation of prolonged prothrombin times and activated partial thromboplastin times. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:283-90.
4. Benedetto M, Barbara M, Daniela C, et al. per il Gruppo di Studio Emostasi. La variabilità preanalitica in coagulazione. *Biochim Clin* 2019;43:313-26.
5. Documenti CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays, approved guidelines, 5th ed. CLSI document H21-A5. CLSI Wayne, PA, 2008.
6. Chang S H, Tillema V, Scherr D A "Percent Correction" formula for evaluation of mixing studies. *Am J Clin Pathol* 2002;117:62-73.
7. Devreese KMJ. Interpretation of normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *Thrombosis Research* 2007;119:369-76.
8. Associazione Italiana Centri Emofilia (AICE). Diagnosi e trattamento degli inibitori acquisiti dei fattori della coagulazione. Raccomandazioni AICE 2014. <https://aiceonline.org/?p=9827> (ultimo accesso: novembre 2019).
9. Rosner E, Pauzner R, Lusky A, et al. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb and Haemost* 1987;57:144-7.
10. World Federation of Hemophilia (WFH). Guidelines for the Management of Hemophilia. 2nd edition (2012). <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1472.pdf> (ultimo accesso: novembre 2019).
11. Wagenman BL, Townsend KT, Mathew P, et al. The laboratory approach to inherited and acquired coagulation factor deficiencies. *Clin Lab Med* 2009;29:229-52.
12. Tripodi A. Laboratory testing for lupus anticoagulants diagnostic criteria and use of screening, mixing, and confirmatory studies. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:373-9.
13. Hong S K, Hwang SM, Kim JE, et al. Clinical significance of the mixing test in laboratory diagnoses of lupus anticoagulant: the fate of the mixing test in integrated lupus anticoagulant test systems. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23:739-44.
14. Thom J, Ivey L, Eikelboom J. Normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2003;1:2689-91.
15. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Official communication of the SSC, Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *JThromb Haemost* 2009;7:1737-40.
16. Akkawat B, Rojnuckarin PA. Modified mixing test with a proposed cutoff value to screen for clotting factor inhibitors. *J Hematol Transfus Med.* 2014;24:137-43.
17. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995;73:247-51.
18. Tripodi A. To mix or not to mix in lupus anticoagulant testing? That is the question. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:385-9.
19. Fritsma GA, Dembitzer FD, Randhawa A, et al. Recommendations for appropriate activated partial thromboplastin time reagent selection and utilization. *Am J Clin Pathol* 2012;137:904-8.
20. Saxena R, Kannan M, Choudhry VP. Laboratory studies in coagulation disorders. *Indian J Pediatr* 2007;74:649-55.
21. Documenti CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory testing for the lupus anticoagulant; approved guideline. CLSI H60-A. CLSI Wayne, PA, 2014.
22. Ohsaka A, Ishii K, Yamamoto T, et al. Automated mixing studies and pattern recognition for the laboratory diagnosis of a prolonged activated partial thromboplastin time using an automated coagulation analyzer. *Thrombosis Research* 2011;128:86-91.
23. Morelli B, Ascari E. Il laboratorio e i nuovi anticoagulanti orali. *Biochim Clin* 2013;37:292-300.