

## Studio dell'effetto delle condizioni pre-analitiche sulla misura dell'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) e dell'effetto del congelamento sulla misura del fattore di von Willebrand (vWF)

Andrea Bolner, Walter Filippini, Alessandro M. Lomeo, Luca Lomeo  
Exacta Central Laboratory, Verona

### ABSTRACT

**Effects of pre-analytical conditions on the measurement of plasminogen activator (PAI-1) inhibitor-1, and of freezing on the von Willebrand factor (vWF) measurement.** The collection, preparation and storage of plasma samples for the assay of plasminogen activator (PAI-1) inhibitor-1, and of the von Willebrand factor (vWF), are steps of the analytical process not well understood and sometimes underestimated: nevertheless, they may play an important role in analytical accuracy. We have studied the effects of centrifugation and of sample storage before testing, with special consideration to the risk of PAI-1 release from platelets to plasma. Further investigations concerned analytes stability in plasma samples during long-term storage in the frozen state. Centrifugation speed and temperature were found to have no effect on in-vitro platelets activation; however, even very short delay of samples centrifugation after blood drawing may lead to false increments of plasma PAI-1. This fact also occurs if samples are immediately refrigerated. Contrarily, immediate centrifugation of the sample, not necessarily refrigerated, allows the best prevention of platelets PAI-1 release. Both the analytes showed good stability following long-term storage of the frozen plasma at -20 °C.

### INTRODUZIONE

L'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) ed il fattore di von Willebrand (vWF) sono marcatori della funzionalità endoteliale che da tempo suscitano interesse per le loro implicazioni nella genesi e nella terapia della trombosi (1-3) e per la loro importanza negli studi di funzionalità del tessuto endoteliale (4); ancora oggi, però, alcuni aspetti relativi alle fasi di raccolta, preparazione e conservazione dei campioni di plasma restano poco conosciuti e talvolta sottovalutati.

Il PAI-1 è una molecola contemporaneamente presente nel plasma e nelle piastrine. Poiché è utile misurare la sola frazione plasmatica, è indispensabile prevenire efficacemente il rilascio di quella piastrinica: ciò implica l'uso di tecniche di pretrattamento del campione in grado di bloccare la ben nota reattività delle piastrine in sede extravasale (5-7). I metodi di analisi commerciali e la letteratura internazionale riportano a tale proposito tecniche di trattamento del campione abbastanza diverse e talvolta contraddittorie (8-10).

A differenza del PAI-1, la tecnica di preparazione del campione per la determinazione del vWF appare meno delicata: infatti, quasi tutti i metodi di analisi commerciali sono concordi nel suggerire l'adozione di normali pratiche di routine per la separazione e la conservazione dei campioni di plasma. Tuttavia, anche per il vWF non man-

cano motivi di interesse che riguardano il suo grado di stabilità nel plasma durante la conservazione che precede l'analisi. Mentre i metodi di analisi commerciali definiscono genericamente "stabile" la molecola nei campioni di plasma congelati a -20°C, la letteratura fornisce dati scarsi e contrastanti a tale riguardo (11-12).

In questo lavoro, condotto in preparazione di uno studio clinico multicentrico sul significato fisiopatologico di PAI-1 e vWF e sull'efficacia di alcuni trattamenti farmacologici, abbiamo voluto approfondire gli aspetti tecnici inerenti la fase pre-analitica al fine di ottimizzare le condizioni che altrimenti condizionerebbero artificialmente l'accuratezza dei risultati.

In particolare, per la determinazione del solo PAI-1 abbiamo studiato il tempo e la temperatura di conservazione del campione prima della centrifugazione, e la velocità, la temperatura ed il tempo di centrifugazione del campione: per entrambe gli analiti, invece, sono stati studiati gli effetti del congelamento del campione di plasma fino al momento dell'analisi.

### MATERIALI E METODI

Tutte le prove sono state condotte analizzando campioni di sangue di soggetti volontari sani raccolti con sistema a vuoto ed anticoagulati con citrato di sodio

0.129 M (Vacutainer, Becton Dickinson, Heidelberg, Germania).

Le determinazioni di PAI-1 e vWF (come antigeni) sono stati eseguiti in doppio secondo le indicazioni del Produttore mediante metodo ELISA (Asserachrom, Diagnostica Stago, Asnières, Francia) reso automatico per lo strumento BRIO (Radim, Roma, Italia).

Il conteggio delle piastrine, prima e dopo centrifugazione dei campioni, è stato eseguito con metodica elettronica (H1 system, Bayer, Tarrytown, NY) e le separazioni del plasma dalla parte corpuscolata mediante centrifuga refrigerabile (Megafuge 1.0, Heraeus Kendro, Hanau, Germania).

Le diverse modalità di preparazione del campione di plasma per la determinazione del PAI-1 sono state valutate negli esperimenti 1-5 di seguito elencati: sui campioni ottenuti dalle singole prove sono state eseguite tanto la conta delle piastrine quanto la determinazione del PAI-1 per valutare contemporaneamente l'efficacia della rimozione delle piastrine ed il loro grado di attivazione *in vitro*.

**Esperimento 1. Velocità di centrifugazione:** 10 aliquote di uno stesso campione sono state centrifugate a diverse velocità di rotazione comprese tra 1000 e 4000 rpm (175 – 2800 g) per il tempo costante di 15 minuti.

**Esperimento 2. Temperatura di centrifugazione:** i campioni di 4 volontari sani (campioni A-D) sono stati prelevati in doppio e conservati per 1 ora ad una temperatura di  $5\pm 1^\circ\text{C}$  fino al momento della centrifugazione. Le due aliquote sono state centrifugate rispettivamente a temperatura ambiente ( $24\pm 2^\circ\text{C}$ ) e refrigerata ( $5\pm 1^\circ\text{C}$ ) per 15 minuti a 2800g.

**Esperimento 3. Temperatura di conservazione prima della centrifugazione:** sono stati prelevati in doppio i campioni di 7 volontari sani (campioni E-M). La prima aliquota è stata conservata per tempi compresi tra 60 e 120 minuti ad una temperatura di  $5\pm 1^\circ\text{C}$  fino al momento della centrifugazione: l'altra aliquota è stata conservata per gli stessi tempi a temperatura ambiente. I campioni refrigerati sono stati poi centrifugati a freddo ( $5\pm 1^\circ\text{C}$ ) per 15 minuti a 2800g mentre i campioni tenuti a temperatura ambiente sono stati centrifugati per gli stessi tempi e velocità ma alla temperatura di  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**Esperimento 4. Tempo di conservazione del campione prima della centrifugazione:** 9 campioni di sangue (campioni N-V) sono stati prelevati in doppio. Un'aliquota è stata conservata per tempi compresi tra 15 e 120 minuti ad una temperatura di  $5\pm 1^\circ\text{C}$  fino al momento della centrifugazione mentre l'altra è stata centrifugata immediatamente entro 5 minuti dal prelievo. Entrambe le centrifugazioni sono state condotte a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  per 15 minuti a 2800g.

**Esperimento 5. Prova di stabilità:** 10 campioni di plasma centrifugati immediatamente dopo il prelievo per 15 minuti a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  sono stati analizzati per PAI-1 e vWF

nella stessa giornata di raccolta dei campioni e dopo 60, 90 e 120 giorni di conservazione di aliquote degli stessi conservate a  $-20^\circ\text{C}$ . Per il solo vWF test è stato protratto fino a 2 anni di conservazione.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

All'aumentare della velocità di centrifugazione, le piastrine vengono progressivamente rimosse dalla frazione liquida finché, a partire da accelerazioni di 1600g, esse non sono più determinabili nel plasma (esperimento 1, Tabella 1): nei campioni privati delle piastrine, i livelli di PAI-1 rilevati sono compatibili con quelli fisiologici (intervallo di riferimento suggerito dal Produttore, 4–43  $\mu\text{g/L}$ ). Poiché PAI-1 resta invariato anche nei campioni ottenuti centrifugando a 2800g, è probabile che l'attivazione o la lisi delle piastrine non dipendano dalla velocità di centrifugazione.

Nonostante la centrifugazione refrigerata dei campioni venga quasi sempre raccomandata, i dati dell'esperimento 2 non evidenziano significative differenze tra questa modalità di separazione e quella effettuata a temperatura ambiente (Tabella 2). E' anzi possibile osservare che la centrifugazione a  $24^\circ\text{C}$  consente l'ottenimento di campioni con valori di PAI-1 leggermente inferiori rispetto a quelli ottenuti nei campioni centrifugati a freddo: ciò può far supporre che il raffreddamento favorisca l'attivazione o la lisi delle piastrine, ma la differenza tra le due serie di dati non presenta la necessaria significatività statistica ( $p= 0.13$ , ANOVA test per dati appaiati).

In merito alla temperatura di conservazione prima della centrifugazione, i risultati dell'esperimento 3 (Tabella 3) evidenziano che la conservazione del campione a temperatura ambiente prima della centrifugazione è probabilmente la principale causa di attivazione piastrinica con il conseguente rilascio di PAI-1 nel plasma. Tale rilascio è ben correlato con il protrarsi della conservazione in queste condizioni: infatti, mentre fino a 90 minuti gli incrementi del PAI-1 nei campioni conservati a temperatura ambiente rispetto ai campioni refrigerati non superano il  $44 \pm 25\%$ , a tempi successivi aumentano marcatamente fino a superare il 200% dopo 120 minuti.

Per meglio evidenziare il fenomeno, ipotizzando che l'attivazione piastrinica possa essere limitata riducendo al minimo il tempo che intercorre tra la raccolta del campione e la separazione del plasma, abbiamo confrontato i valori di PAI-1 ottenuti in campioni centrifugati immediatamente dopo il prelievo e quelli determinati dopo refrigerazione a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  per tempi compresi tra 15 e 120 minuti (esperimento 4, Tabella 4). Anche se la prova necessiterebbe di un disegno più rigoroso in cui ciascun campione viene refrigerato per tempi diversi, appare già evidente che, i valori di PAI-1 dopo centrifugazione immediata risultano nettamente inferiori rispetto a quelli dei campioni refrigerati. Ancora una volta, l'incremento percentuale

**Tabella 1**

Effetto della velocità di centrifugazione sulla rimozione delle piastrine dal campione di plasma e sui livelli di PAI-1 plasmatico

Velocità di rotazione (rpm)	Accelerazione (g)	Piastrine (media±SD) (10 <sup>9</sup> /L)	PAI-1 (media±SD) (µg/L)
0	0	235 ± 23	non analizzato
1000	175	74 ± 8	170.8 ± 8.6
2000	700	11 ± 2	31.0 ± 2.8
3000	1600	0	9.9 ± 1.0
4000	2800	0	10.1 ± 1.1

**Tabella 2**

Differenze (Δ%) tra il PAI-1 (µg/L) determinato in campioni centrifugati a 24 ± 2°C ed a 5±1°C

Campione	PAI-1 (µg/L)	PAI-1 (µg/L)	Δ%
	Centrifugazione a 5±1°C	Centrifugazione a 24±2°C	
A	12.3	12.8	+ 4.1
B	14.9	10.9	- 26.8
C	64.2	62.7	- 2.4
D	19.3	15.6	- 19.2

**Tabella 3**

Differenze (Δ%) tra il PAI-1 (µg/L) determinato in campioni conservati a 24 ± 2°C ed a 5±1°C per tempi compresi tra 60 e 120 minuti

Campione	PAI-1 (µg/L)	PAI-1 (µg/L)	Tempo di conservazione (min)	Δ%
	Conservazione a 5±1°C	Conservazione a 24±2°C		
E	15.7	49.7	120	+ 216.6
F	28.0	65.6	110	+ 134.3
G	16.8	38.3	100	+ 128.0
H	29.7	42.9	90	+ 44.4
I	21.5	26.0	80	+ 20.9
L	12.8	16.8	70	+ 31.3
M	15.5	27.7	60	+ 78.7

**Tabella 4**

Differenze ( $\Delta\%$ ) tra il PAI-1 ( $\mu\text{g/L}$ ) determinato in campioni conservati a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  per tempi compresi tra 15 e 120 minuti ed in campioni centrifugati entro 5 minuti dal prelievo

Campione	Tempo di conservazione (min)	PAI-1 ( $\mu\text{g/L}$ )		$\Delta\%$
		Conservazione a $5\pm 1^\circ\text{C}$	Centrifugazione immediata	
N	120	38.6	8.8	+ 338.6
O	105	17.6	1.4	+ 1157.1
P	90	39.6	23.6	+ 67.7
Q	45	50.7	21.1	+ 140.3
R	35	43.0	30.0	+ 43.3
S	30	12.6	7.8	+ 61.5
T	25	16.7	12.2	+ 36.9
U	20	29.1	24.1	+ 20.7
V	15	9.7	6.3	+ 54.0

del PAI-1 è ben correlato con i tempi di conservazione: infatti, se fino a 35 minuti, il PAI-1 incrementa del  $43\pm 15\%$  rispetto ai campioni centrifugati immediatamente, per tempi successivi, raggiunge valori estremamente significativi ( $426\pm 501\%$ ).

Riguardo infine alla stabilità nel plasma a lungo termine, le elaborazioni statistiche effettuate sui dati delle prove di stabilità (esperimento 5) non dimostrano l'esistenza di differenze significative tra le serie dei dati basali ( $t_0$ ) e quelle dei tempi successivi, tanto per PAI-1 quanto per vWF. Ad ulteriore conferma, gli scostamenti percentuali (bias%) medi dei risultati rispetto ai valori al tempo  $t_0$  sono in tutti i casi inferiori all'errore analitico totale ( $TE = 1.65 \cdot CV\% \text{ inter-saggio} + \text{bias}\%$ ) determinato per i due metodi (18.8% e 18.1% con variabilità analitica inter-saggio 6.3 e 6.5% rispettivamente per PAI-1 e vWF, Tabella 5).

**Tabella 5**

Effetto della conservazione a lungo termine del plasma a  $-20^\circ\text{C}$ . I dati riportati sono i bias% medi  $\pm$  SD calcolati rispetto al valore basale ottenuto al tempo 0 per PAI-1 e vWF

Analita	60 giorni	90 giorni	120 giorni	1 anno	2 anni
PAI-1	$3.7 \pm 8.6$	$8.4 \pm 9.9$	$5.5 \pm 8.2$	-	-
vWF	$-2.3 \pm 5.8$	$-2.9 \pm 8.2$	$0.4 \pm 6.7$	$4.7 \pm 6.2$	$-5.0 \pm 8.8$

## CONCLUSIONI

Le prove effettuate dimostrano che è possibile ottenere un plasma certamente privo di piastrine centrifugando i campioni a più di 1600g per 15 minuti e che la velocità e la temperatura di centrifugazione del campione non sono rilevanti ai fini del rilascio del PAI-1 piastrinico.

Invece, la permanenza del campione non centrifugato a temperatura sia ambientale che refrigerata determina, in ogni caso, l'attivazione piastrinica ed il conseguente rilascio del PAI-1 nel plasma.

Solo l'immediata centrifugazione dei campioni ematici dopo il prelievo può garantire una buona accuratezza del dato analitico. Qualsiasi attesa, anche in condizioni refrigerate, può determinare in vitro importanti incrementi del PAI-1 e la conseguente diminuzione della specificità diagnostica del test.

Dopo congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , il PAI-1 resta stabile nel plasma per almeno 4 mesi mentre il vWF si conserva inalterato per almeno 2 anni: sono in corso nel nostro laboratorio ulteriori prove riguardanti la stabilità del PAI-1 a più lungo termine.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barbash GI, Hod H, Roth A, Miller HI et al. Correlation of baseline plasminogen activator inhibitor activity with patency of the infarct artery after thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1989; 64: 1231-5.
2. Vaughan DE, Declerck PJ, Van Houtte E et al. Reactivated recombinant plasminogen activator inhibitor 1 (rPAI-1) effectively prevents thrombolysis in vivo. *Thromb Haemost* 1992; 68: 60-3.
3. Levi M, Biemond BJ, Van Zonneveld AJ et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor 1 activity results in promotion of endogenous thrombolysis and inhibition of thrombus extension in models of experimental thrombosis. *Circulation* 1992; 85: 305-12.
4. Mannucci PM. Von Willebrand factor. A marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb* 1998; 18: 1359-62.
5. Erickson LA, Hekman CM, Loskutoff DJ. The primary plasminogen activator inhibitor in endothelial cells, platelets, serum and plasma are immunologically related. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 8710-4.
6. Kruithof EKO, Tran-Thang C, Bachmann F. Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor from human platelets. *Thromb Haemost* 1986; 55: 201-5.
7. Sprengers ED, Akkerman JWN, Jansen BG. Blood platelet plasminogen activator inhibitor: two different pools of endothelial cell type plasminogen activator in human blood. *Thromb Haemost* 1986; 55: 325-9.
8. Blauhut B, Harringer W, Bettelheim P et al. Comparison of the effects of aprotinin and tranexamic acid on blood loss and related variables after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108: 1083-91.
9. Seljeflot I, Haaland AH, Arnesen H. Stability of plasma PAI-1 at room temperature. *Thromb Res* 1994; 73: 75-8.
10. Juhan-Vague I, Alessi MC, Fossat C et al. Plasma determination of plasminogen activator inhibitor 1 antigen must be performed in blood collected on antiplatelet/anticoagulant mixture. *Thromb Haemost* 1987; 58/4: 1096.
11. Buchta C et al. Stability of coagulation factors in thawed, solvent/detergent-treated plasma during storage at 4 degrees C for 6 days. *Vox Sang* 2004; 87(3): 182-6.
12. Wardrop KJ, Brooks MB. Stability of hemostatic proteins in canine fresh frozen plasma units. *Vet Clin Pathol* 2001; 30(2): 91-5.