

INDICE

ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	3
<i>Meccanismo della coagulazione del sangue</i>	4
<i>Emostasi (fase vascolare, piastrinica, coagulativa e fibrinolitica)</i>	5
<i>Via estrinseca ed intrinseca</i>	6
<i>Malattie emorragiche</i>	9
<i>Malattie trombotiche</i>	10
<i>Marcatori per patologie coagulative</i>	12
<i>pT</i>	12
<i>aPTT</i>	13
<i>Confronto tra i due reagenti- Cephascreen e PTT-automate.</i>	14
OBBIETTIVO DELLA TESI	21
MATERIALI E METODI	22
<i>Campioni Provenienti dal Reparto (Interni)</i>	22
<i>Campioni Provenienti dal Front Office (Esterni)</i>	23
<i>Processazione del Campione in Laboratorio</i>	23
<i>Definizioni e caratteristiche dei sistemi POCT</i>	24
<i>Vantaggi dei sistemi POCT</i>	28
<i>Svantaggi dei sistemi POCT</i>	29
<i>Sistema analitico qLabs Micropoint</i>	29
<i>Sistema analitico Xprecia Stride</i>	31
CONCLUSIONI	33
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	35

ABSTRACT

La terapia con anticoagulanti orali (TAO) è la principale per il trattamento di patologie come embolia polmonare (EP) e trombosi venosa profonda (TVP), i pazienti sottoposti a questo tipo di terapia sono soggetti a continuo monitoraggio del tempo di protrombina (PT) per verificare che non ci siano delle alterazioni al processo coagulativo che possono essere legate a malattie trombotiche o emorragiche. Vista questa esigenza, molte Aziende del settore, hanno optato per lo sviluppo di nuovi sistemi che permettono un'analisi in tempi relativamente brevi. La soluzione si è trovata sviluppando dei "coagulometri" portatili che permettono di eseguire il PT e/o l'INR su una goccia di sangue capillare invece che su prelievo venoso.

INTRODUZIONE

La coagulazione del sangue è un processo biologico altamente complesso e sofisticato, il cui obiettivo è minimizzare la fuoriuscita di sangue quando si verifica una lesione dei vasi sanguigni.

La funzione del processo coagulativo è innescare una cascata di reazioni enzimatiche che porta alla formazione di un coagulo stabile e solido, capace di durare nel tempo senza dissolversi nei fluidi biologici.

Durante il processo coagulativo si possono distinguere tre fasi fondamentali:

- Fase vascolare; Durante questa fase iniziale, i vasi sanguigni si contraggono per ridurre il flusso di sangue nella zona lesionata. Questa contrazione aiuta a limitare la perdita di sangue e a preparare il sito dove è avvenuto il danno per le fasi successive del processo di coagulazione.
- Fase piastrinica; In questa fase, le piastrine (cellule del sangue responsabili della formazione del coagulo) si vanno ad aggregare nel sito del danno formando un primo tappo detto “tappo piastrinico” che ha come scopo quello di diminuire la quantità di sangue che fuoriesce dal sito della lesione
- Fase coagulativa; la fase coagulativa è la più complessa e consiste in una cascata di reazioni enzimatiche. Durante questa fase, il fibrinogeno, una proteina solubile che si trova nel sangue, viene trasformato in fibrina che a sua volta è una proteina insolubile che ha il compito di formare una rete reticolare intrecciandosi con il “tappo piastrinico” stabilizzando e consolidando il coagulo.

La coagulazione del sangue è regolata da un delicato equilibrio tra i fattori pro-coagulanti ed anticoagulanti presenti nel sistema sanguigno, uno squilibrio tra questi due gruppi di fattori può portare a condizioni patologiche. Ad esempio, un eccesso di fattori pro-

coagulanti può provocare malattie trombotiche, caratterizzate dalla formazione anomala di coaguli all'interno dei vasi sanguigni. Al contrario, una carenza di fattori pro-coagulanti o un eccesso di anticoagulanti può portare a malattie emorragiche, in cui la formazione di coaguli è insufficiente a fermare il sanguinamento.

Meccanismo della coagulazione del sangue

La coagulazione del sangue è un processo naturale, che si instaura come normale risposta del nostro organismo ad un danno, il quale altrimenti porterebbe ad una massiccia perdita di sangue.

I sistemi che vengono coinvolti durante il riparo del danno sono quattro: i vasi e le varie componenti della parete vascolare, le piastrine, una cascata enzimatica relativa alla coagulazione ed il sistema fibrinolitico. Perciò, la coagulazione del sangue può essere suddivisa, a sua volta, in quattro fasi fondamentali: fase vascolare, fase piastrinica, fase coagulativa e fase fibrinolitica.

Tutte le fasi sono strettamente connesse tra di loro e si influenzano reciprocamente.

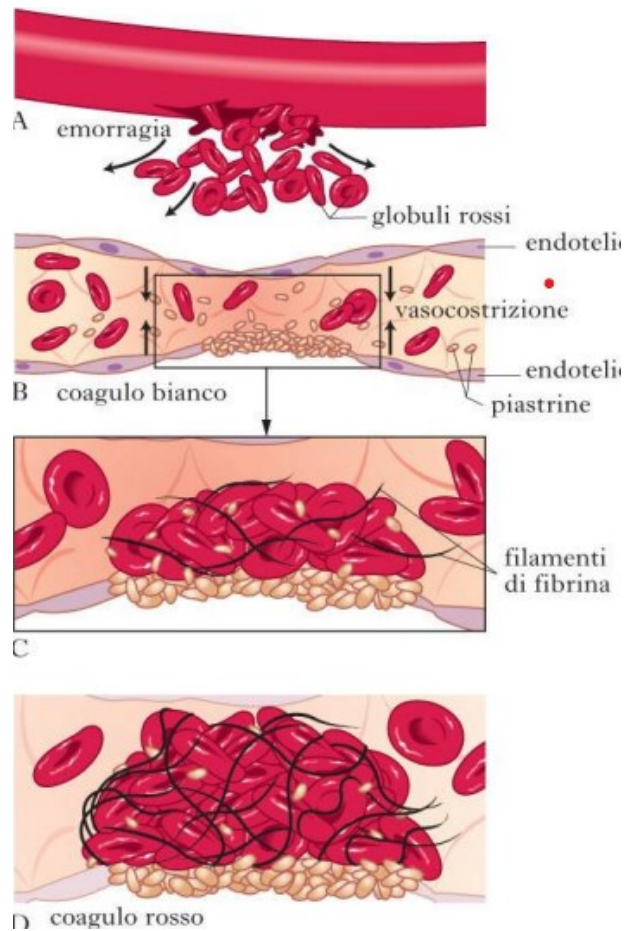


Figura 1. Processo emostatico

Emostasi (fase vascolare, piastrinica, coagulativa e fibrinolitica)

Fase vascolare

Durante la prima fase, si verifica il processo di vasocostrizione a seguito della lesione del vaso. Questo processo ha il compito di ridurre il flusso ematico nella zona del danno, diminuendo così la fuoriuscita di sangue.

Nella fase vascolare vengono coinvolti diversi fattori, tra cui uno dei principali è l'endotelina, rilasciata dalle cellule endoteliali danneggiate.

Fase piastrinica

Nella fase successiva, quella piastrinica, le piastrine coinvolte nel processo aderiscono al collagene, una proteina fibrosa che viene esposta dal tessuto connettivo sottostante tramite il fattore di Von Willebrand, permettendo così la formazione del tappo piastrinico nella zona lesionata.

Una volta che le piastrine aderiscono al collagene devono subire un processo di attivazione piastrinica che comporta nel cambiamento conformazionale con conseguente rilascio di granuli che contengono ADP, trombossano e altre sostanze chimiche che amplificano la risposta emostatica. L'ADP e il trombossano svolgono un ruolo cruciale nella formazione del tappo piastrinico, poiché stimolano altre piastrine a intervenire nel punto della lesione.

Fase coagulativa

Il terzo step, o fase coagulativa, ha il compito di formare il tappo emostatico secondario.

Questo tappo è costituito da fibrina, che si forma a partire da un precursore chiamato fibrinogeno.

La fase coagulativa è la risultante di una serie di reazioni mediate dai “fattori della coagulazione”

Fase fibrinolitica

La fase fibrinolitica consiste nel processo che porta alla dissoluzione del coagulo di fibrina, una volta completata la riparazione del vaso sanguigno. Questo step avviene grazie alla presenza di una proteasi non specifica chiamata “plasmina” che ha il compito di degradare la fibrina, la quale verrà poi rimossa dalla circolazione.

Via estrinseca ed intrinseca

La coagulazione del sangue avviene attraverso due vie principali: la via estrinseca e la via intrinseca. Queste vie portano alla formazione finale di fibrina e di conseguenza alla formazione di un coagulo stabile e insolubile.

- *La via estrinseca*

La via estrinseca della coagulazione si attiva in risposta ad un danno tissutale, che esponendo il fattore tissutale (TF) all'interno del sangue fa attivare questo meccanismo. Questo evento si verifica, solitamente, quando la barriera fisica che separa il flusso di sangue dai tessuti viene danneggiata, per esempio quando ci sono delle ferite o dei traumi.

Perciò, quando si verifica un danno, il fattore tissutale (TF o fattore III) viene esposto e rilasciato dalle cellule danneggiate. Una volta rilasciato il TF si lega al fattore VII, presente nel sangue, e lo attiva trasformandolo in fattore VII_a(attivato).

Il complesso che si è formato tra fattore tissutale (FT) ed il fattore VII_a, in presenza di ioni calcio (Ca²⁺⁺), a sua volta converte il fattore X e lo trasforma in X_a (attivato). Questo step è altamente fondamentale in quanto il fattore X_a attiva la fase della coagulazione comune.

Il fattore X_a in combinazione con il fattore V_a ha il compito di formare un complesso chiamato protrombinasi che a sua volta converte la protrombina (fattore II) in trombina (fattore II_a). La trombina svolge un ruolo fondamentale in quanto ha il compito di trasformare il fibrinogeno (fattore I) in fibrina che polimerizzando forma una rete di fibrina stabile formando un coagulo che è alla base del processo della coagulazione.

- *La via intrinseca*

La via intrinseca viene chiamata così perché tutti i fattori necessari per la sua attivazione sono presenti naturalmente nel sangue.

La via intrinseca inizia quando vi è attivazione del fattore XII (fattore di Hageman), l'attivazione di questo fattore porta alla formazione del fattore XII_a. Questo fenomeno si verifica quando il sangue viene a contatto con delle superfici cariche negativamente.

Il fattore X_a a sua volta attiva il fattore XI trasformandolo in fattore XI_a, che a sua volta, in presenza di ioni Calcio (Ca²⁺⁺) attiva il fattore IX convertendolo in fattore IX_a.

Lo step successivo vede coinvolto il fattore IX_a ed il fattore VIII_a (che viene attivato dalla trombina) che insieme formano il complesso tenasi intrinseco sulla superficie delle piastrine.

Il complesso tenasi intrinseco attiva il fattore X trasformandolo in fattore X_a.

Una volta attivato il fattore X_a, la via intrinseca si unisce alla via comune della coagulazione.

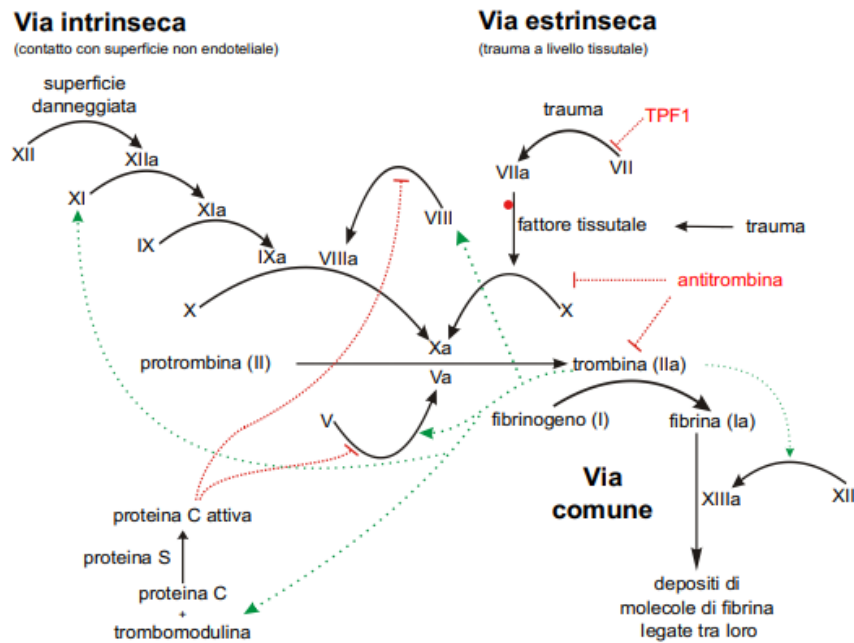


Figura 2. Cascata coagulativa

Malattie emorragiche

Le malattie emorragiche sono caratterizzate da una eccessiva perdita di sangue in seguito a traumi. Queste malattie possono essere causate da una grande varietà di fattori relativi ad: anomalie di vasi sanguigni, disfunzioni piastriniche o difetti dei fattori della coagulazione.

Le anomalie dei vasi sanguigni sono caratterizzate, generalmente, da una carenza di vitamina C, questa mancanza porta ad indebolire i vasi sanguigni provocando un eccesso di sanguinamento. Queste malattie sono di carattere ereditario e quindi, tendono ad essere trasmesse di generazione in generazione.

Tra le disfunzioni piastriniche possiamo distinguere, in particolar modo, due tipi di malattie note come trombocitopenia e trombocitopatia. La trombocitopenia si verifica attraverso una riduzione delle piastrine in circolo nel sangue e può essere causata da infezioni, farmaci o malattie relative al midollo osseo mentre le trombocitopatie sono caratterizzate da un malfunzionamento delle piastrine, perciò, il numero delle piastrine in circolo rimane nella norma ma quello che cambia è a livello qualitativo.

Tra i difetti dei fattori della coagulazione ci sono, di particolare importanza, l'emofilia e la malattia di Von Willebrand, entrambe di origine ereditaria. L'emofilia è caratterizzata da una mancanza dei fattori della coagulazione, in particolar modo il fattore VII ed il fattore IX che causano rispettivamente emofilia di tipo A ed emofilia di tipo B. La malattia di Von Willbrand è causata da una mancanza o un malfunzionamento del fattore di Von Willebrand che impedisce una corretta aggregazione e adesione delle piastrine al sito in cui si è verificata lesione vascolare.

Malattie trombotiche

Le malattie trombotiche sono delle malattie che si verificano prevalentemente nei soggetti anziani, queste malattie si manifestano con anomale formazioni di coaguli di sangue (trombi) all'interno dei vasi sanguigni portando all'insorgenza di condizione patologiche note come: ischemie o ictus.

Si possono distinguere diversi tipi di malattie trombotiche e a seconda della zona dove si verificano possiamo avere due casistiche principali: embolia polmonare e trombosi venosa profonda (TVP).

L'embolia polmonare si verifica nel caso in cui un embolo si sposta dalla zona di interesse ed arriva a livello polmonare provocando l'ostruzione di una o più arterie.

La trombosi venosa profonda (TVP) si manifesta quando un coagulo si forma nel sangue e si trasferisce nelle vene profonde (tipicamente nelle gambe) provocando dolore, gonfiore e arrossamento della zona interessata.

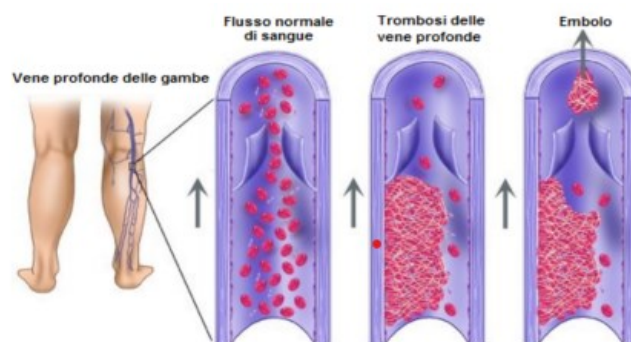


Figura 3. Formazione TVP

Tuttavia, esiste una netta differenza tra trombo ed embolo.

Il trombo è un coagulo di sangue che si forma all'interno del vaso sanguigno dove si è verificata la lesione. Il trombo ha una composizione molto complessa in quanto è costituito da piastrine, fibrina, globuli rossi e globuli bianchi. La pericolosità dei trombi è data dal fatto che questi possono crescere le proprie dimensioni ma allo stesso tempo

possono dissolversi spontaneamente. Le malattie legate alla presenza di trombi sono principalmente trombosi venosa profonda (TVP) e infarto del miocardio.

L'embolo è una massa che si muove all'interno del corpo da un distretto all'altro attraverso il flusso sanguigno. Si può parlare di diversi tipi di emboli in quanto possono essere: solidi, liquidi o gassosi. Gli emboli possono derivare dal distacco di trombi, si parla di embolia trombotica; oppure possono essere costituiti da altre sostanze come grasso (embolia grassa) o gas (embolia gassosa). Le complicazioni alla quale possono portare gli emboli sono: embolia polmonare, ictus o ischemia d'organo.

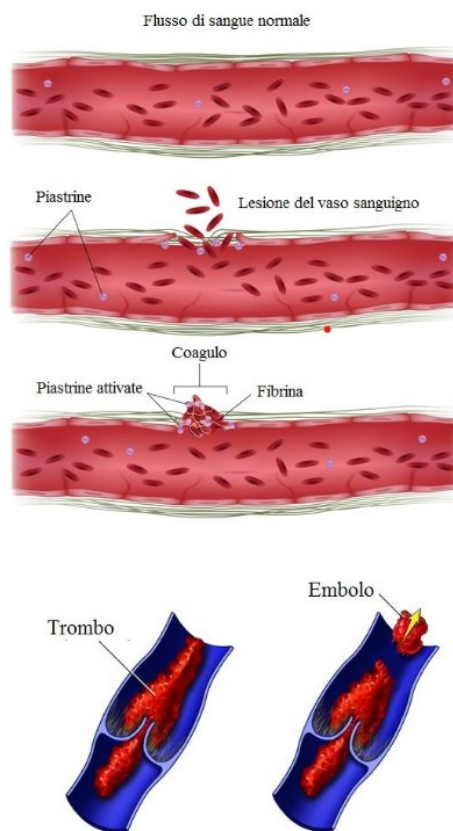


Figura 4. Trombo ed Embolo

Marcatore per patologie coagulative

I due marcatori dosati in laboratorio per valutare presenza o meno di patologie coagulative sono: pT (tempo di protrombina) e aPTT (tempo di tromboplastina parziale attivata).

Il pT ha il compito di verificare l'efficacia della via estrinseca e la via comune della coagulazione andando a monitorare il tempo necessario da parte del plasma per formare un coagulo in seguito all'aggiunta di tromboplastina e calcio.

L'aPTT ha il compito di monitorare la corretta efficacia della via intrinseca e la via comune della coagulazione. In questo caso si va a misurare il tempo necessario per la formazione del coagulo dopo l'aggiunta di reagenti attivanti e calcio. Questo test viene utilizzato per verificare il corretto funzionamento dei fattori VII, IX, XI e XII.

pT

Il pT, come detto in precedenza, serve per monitorare la funzionalità della via estrinseca e la via comune della coagulazione. Ma in particolare si utilizza per:

- Monitorare la terapia anticoagulante con Warfarin;
- Valutare la corretta funzione del fegato;
- Diagnosticare disturbi della coagulazione;
- A scopo pre-operatorio;

Il test del pT è molto semplice e richiede alcuni passaggi preanalitici fondamentali per arrivare ad un buon preparato che consenta a sua volta la stipulazione di risultati altamente affidabili.

Il primo step che viene condotto è quello del prelievo di sangue venoso da parte dell'infermiere che ha il compito poi di inoculare in liquido biologico all'interno di una provetta sterile contenente anticoagulante che impedisce la formazione di coaguli

all'interno del tubo. L'anticoagulante maggiormente impiegato in questi casi è il citrato di sodio che ha il compito di sequestrare gli ioni Ca^{2++} .

La provetta viene poi messa all'interno di una centrifuga, la quale separa il plasma, quindi la parte liquida di sangue, dagli elementi cellulari che possono essere: globuli bianchi, globuli rossi e piastrine.

Per la valutazione del pT si utilizza la parte liquida di sangue, il plasma, al quale vengono aggiunti tromboplastina e calcio. Il ruolo del calcio è quello di neutralizzare l'effetto del citrato permettendo al plasma di coagulare. Successivamente all'aggiunta di tromboplastina e calcio viene valutato il tempo, in secondi, occorrente alla formazione del coagulo. Questo lasso di tempo viene chiamato tempo di protrombina (pT). Il risultato ottenuto da questo test viene confrontato con un valore di controllo. Generalmente, il valore di pT, viene espresso come INR, ovvero, un parametro utilizzato per standardizzare i risultati di questo test tra diversi laboratori. L'INR viene calcolato:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT}_{\text{patient}}}{\text{PT}_{\text{meannormal}}} \right)^{\text{ISI}}$$

Figura 5. Formula INR

Si prende in considerazione il pT del paziente che viene diviso per il pT normale medio, il tutto viene elevato ad ISI (International Sensitivity Index) che viene fornito dal produttore del reagente, questo indice ha il compito di correggere le variazioni tra diversi lotti di reagenti. I valori normali di pT possono variare da 11 a 13,5 secondi. I valori normali di INR per soggetti non sottoposti a terapia sono compresi tra 0,8 e 1,2. Mentre nei soggetti sottoposti a terapia con Warfarin i valori possono variare da 2,0 a 3,5.

aPTT

Come detto in precedenza l'aPTT è un esame che viene svolto in laboratorio per andare a valutare il corretto funzionamento del sistema di coagulazione del sangue, in particolare la via intrinseca e la via comune della coagulazione. L'aPTT serve a:

- Monitorare la terapia con eparina
- Diagnosi di disordine della coagulazione
- A scopo pre-operatorio

Anche in questo caso si effettua un prelievo di sangue venoso che viene riposto in provetta sterile contenente anticoagulante (citrato di sodio). Lo step successivo prevede la centrifugazione del campione per far sì che vengano separate le due fasi; quindi, avremo una fase liquida contenente plasma e una parte contenente elementi cellulari come globuli rossi, globuli bianchi e piastrine.

Al plasma vengono aggiunti dei reagenti: fosfolipidi che hanno il compito di simulare le membrane delle piastrine e un attivatore che può essere di diverso tipo, tra questi distinguiamo caolino, acido ellagico e silice micronizzata.

Il tempo che occorre per la formazione del coagulo dopo aggiunta dei reagenti viene misurato in secondi e viene espresso attraverso un parametro chiamato aPTT.

I valori di aPTT normali possono variare da 25 fino a 35 secondi.

In caso di pazienti in terapia con anticoagulanti, il valore di aPTT normale è di circa 1,5/2,5 volte superiore ad un paziente che non è in terapia.

Se l'aPTT è prolungato può essere indice di carenza dei fattori della coagulazione.

Confronto tra i due reagenti- Cephascreen e PTT-automate.

Durante il mio periodo di tirocinio per la preparazione della tesi di laurea, ho avuto l'opportunità di partecipare ad uno studio condotto presso il laboratorio analisi dell'INRCA di Ancona, il quale scopo era quello di andare a confrontare due diversi reagenti utilizzati per la valutazione del tempo di tromboplastina parziale attivata (aPTT) nei pazienti in trattamento con eparina sodica non frazionata (UFH).

La terapia con UFH è ampiamente utilizzata nei reparti di terapia intensiva per monitorare costantemente le condizioni dei pazienti con un quadro clinico critico. Allo stesso tempo il test di aPTT, come si evince dalla letteratura, è altamente sensibile all'eparina sodica non frazionata (UFH).

Data la sensibilità di questo test all'UFH si sono stabiliti, per ogni laboratorio, nuovi valori terapeutici da fornire ai reparti al fine di garantire un adeguato monitoraggio della terapia.

In questo studio sono stati messi a confronto due reagenti per determinare la correlazione tra di essi: Cephascreen e PTT-automate.

Cephascreen è un reagente prodotto dalla STAGO che viene fornito in forma liquida all'interno di particolari boccette di plastica, e viene utilizzato per la valutazione del tempo di tromboplastina parziale attivata. Questo reagente contiene:

- Cefalina; un sostituto delle piastrine derivante dai tessuti cerebrali del coniglio che ha il compito di attivare la via intrinseca della coagulazione,
- Un attivatore polifenolico; che ha il compito di aumentare la sensibilità e la precisione del test,
- Medium-Tampone; che garantisce un ambiente adeguato alle reazioni di coagulazione.

Il reagente viene fornito in confezioni contenenti 12 fiale da 4mL ciascuna, pronte all'uso, questo conferisce al reagente la possibilità di essere utilizzato senza alcun processo preanalitico.

Come il precedente, anche il reagente **PTT-automate** viene prodotto dall'azienda STAGO. Per cui si presenta confezionato in confezioni contenenti 12 fiale da 4mL ciascuna, direttamente pronte all'uso. La differenza sostanziale che si nota è a livello di composizione chimica, infatti, il PTT-automate è costituito da:

- Cefalina; un sostituto delle piastrine derivante dai tessuti cerebrali del coniglio che ha il compito di attivare la via intrinseca della coagulazione,
- Silice; che svolge il ruolo di attivatore della coagulazione, in particolare stimola la via intrinseca attivando le proteine della coagulazione aiutando ad avere risultati più precisi e sensibili nel test di aPTT in presenza di eparina sodica non frazionata (UFH),

- Medium-Tampone; il quale scopo è quello di mantenere un pH stabile durante le reazioni di coagulazione, garantendo che le condizioni siano ottimali per l'attività degli enzimi e delle proteine che sono coinvolte nel processo di coagulazione.

In questo studio sono state condotte due analisi in contemporanea, una “in vitro” e una “in vivo”.

Nelle prove “in vitro” è stato raccolto un pool di plasmi derivanti da diversi pazienti/donatori ed è stato aliquotato in 11 provette che, successivamente, sono state incubate con concentrazioni crescenti di eparina (da 0.2 a 1.2 UI/mL).

Una volta finito il periodo di incubazione la miscela è stata analizzata utilizzando i due reagenti (Cephascreen e PTT-Automate).

Le stesse metodiche sono poi state ripetute “in vivo” su 94 plasmi di pazienti con aPTT > 45 sec., calcolato attraverso l'utilizzo di Cephascreen.

I dati ottenuti da questo confronto sono stati inseriti in un Software per l'analisi statistica.

Di seguito vediamo i risultati che vengono espressi in RATIO; con il termine ratio si intende il rapporto che c'è tra il tempo di coagulazione del campione del paziente e il tempo di coagulazione di un plasma normale o di controllo. Questo valore viene ottenuto dalla formula:

$$\text{Ratio APTT} = \frac{\text{Tempo APTT del paziente}}{\text{Tempo APTT del plasma normale o di controllo}}$$

Figura 6. Formula per il calcolo della RATIO

Di seguito abbiamo la tabella contenente i dati ottenuti:

	Values AUTO2 (X) PTT Automate		Values RMAX (Y) Cephascreen
- Minimum	0.74 Ratio	- Minimum	0.72 Ratio
- Maximum	8.00 Ratio	- Maximum	8.00 Ratio
- Mean	1.62 Ratio	- Mean	1.38 Ratio

AUTO 2 (X) **PTT-Automate** | RMAX (Y) **Cephascreen** | Ratio Y/X (%)

Sample ID	Result	Result	
1	0.98	0.94	95.92
2	1.53	1.22	79.74
3	1.02	0.86	84.31
4	1.98	1.31	66.16
5	1.19	1.05	88.24
6	1.10	1.06	96.36
7	1.03	0.91	88.35
8	1.26	1.18	93.65
9	1.13	1.00	88.50
10	1.15	0.91	79.13
11	1.54	1.32	85.71
12	1.37	1.21	88.32
13	1.30	1.07	82.31
14	1.13	0.94	83.19
15	1.09	1.00	91.74
16	0.90	0.99	110.00
17	1.08	0.91	84.26
18	1.11	1.00	90.09
19	1.10	1.05	95.45
20	1.34	1.23	91.79
21	1.27	1.35	106.30
22	5.29	2.94	55.58
23	2.53	2.72	107.51
24	3.49	2.30	65.90
25	1.76	1.41	80.11
26	1.08	0.96	88.89
27	0.99	0.94	94.95
28	1.47	1.18	80.27
29	1.16	1.07	92.24
30	1.09	0.90	82.57
31	1.05	0.97	92.38
32	1.12	0.91	81.25
33	1.16	1.05	90.52
34	1.50	1.24	82.67
35	1.06	0.93	87.74
36	1.40	1.22	87.14
37	1.07	0.90	84.11
38	1.17	1.00	85.47
39	1.15	1.03	89.57
40	1.09	1.00	91.74

41	1.01	0.98	97.03
42	1.06	0.98	92.45
43	0.89	0.92	103.37
44	0.95	0.87	91.58
45	0.87	0.85	97.70
46	1.71	1.54	90.06
47	1.08	0.99	91.67
48	1.11	1.02	91.89
49	0.87	0.87	100.00
50	1.32	1.23	93.18
51	2.91	1.87	64.26
52	1.18	1.16	98.31
53	8.00	8.00	100.00
54	1.94	1.49	76.80
55	1.83	1.56	85.25
56	1.13	1.11	98.23
57	1.38	1.29	93.48
58	1.29	1.27	98.45
59	3.01	2.43	80.73
60	1.12	0.98	87.50
61	1.60	1.37	85.63
62	0.96	0.92	95.83
63	1.02	0.92	90.20
64	1.39	1.13	81.29
65	2.63	1.88	71.48
66	1.00	0.88	88.00
67	0.84	0.84	100.00
68	0.74	0.72	97.30
69	1.30	1.15	88.46
70	1.42	1.20	84.51
71	0.88	0.84	95.45
72	1.04	0.97	93.27
73	1.06	0.97	91.51
74	1.34	1.35	100.75
75	1.25	1.06	84.80
76	2.29	1.82	79.48
77	1.48	1.22	82.43
78	1.49	1.22	81.88
79	1.50	1.37	91.33
80	1.40	1.09	77.86
81	2.69	1.91	71.00
82	1.47	1.28	87.07
83	1.40	1.07	76.43
84	1.44	2.27	65.99

85	1.77	1.50	84.75
86	8.00	8.00	100.00
87	1.40	1.09	77.86
88	2.69	1.91	71.00
89	1.47	1.28	87.07
90	3.66	2.44	66.67
Mean	1.62	1.38	

Tabella 1. Confronto tra RATIO ottenuto con Cephascreen e PTT-automate

Dai risultati è possibile vedere come nelle prove “in vitro” i tempi dell’aPTT con il nuovo metodo (PTT-Automate), in funzione della concentrazione di eparina, risultano più lunghi rispetto al metodo in uso (Cephascreen). Questo aumento di tempo tende a crescere a concentrazioni crescenti di eparina. Le analisi “in vivo” confermano quanto descritto dalle analisi “in vitro”.

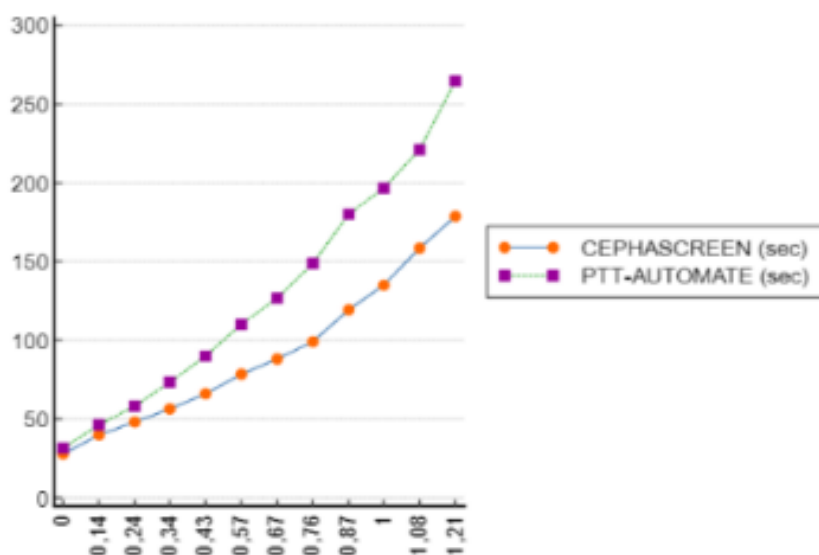


Figura 7. Cephascreen e PTT-automate in funzione della concentrazione di eparina

Per cui le due prove hanno dimostrato che c'è una differenza sostanziale tra le due metodiche. Per questo è stata stipulata una nuova tabella in cui sono stati ricalcolati nuovi range terapeutici per i pazienti in terapia con eparina sodica non frazionata, così facendo, si è evitato di esporre i soggetti ad un rischio trombotico dovuto alla maggiore sensibilità all'eparina della metodica con PTT-Automate

Cephascreen aPTT (secondi)	soluzione di Eparina in fisiologica concentrazione = 40 UI / ml	PTT-Automate aPTT (secondi)
= o < 45	bolo di 60 UI/kg + aumento di 3 UI/kg/h	= o < 56
45 – 64	bolo di 60 UI/kg + aumento di 2 UI/kg/h	56 – 86
65 – 70	bolo di 30 UI/kg + aumento di 1 UI/kg/h	87 – 95
71 – 79	aumento di 1 UI/kg/h	96 – 109
80 – 100	nessuna modifica	110 – 142
101 – 115	diminuzione di 1 UI/kg/h	143 – 166
116 – 125	stop di 30 min + diminuzione di 2 UI/kg/h	167 – 181
126 – 150	stop di 60 min + diminuzione di 3 UI/kg/h	182 – 221
> 150	stop di 60 min + diminuzione di 4 UI/kg/h	> 221

Tabella 2. Tabella di conversione aPTT per i pazienti in terapia con UFH

OBBIETTIVO DELLA TESI

L'obiettivo della tesi è quello di andare a confrontare due sistemi point of care (POCT); xPrecia Stride e il nuovo sistema analitico qLabs-Micropoint, per verificare che ci sia effettivamente una diretta relazione tra i due sistemi al fine di inserire i due strumenti come POCT di Back Up.

MATERIALI E METODI

Il campione di sangue che arriva in laboratorio può provenire da due fonti principali: i reparti ospedalieri (interni) e il front office (esterni). La gestione e la preparazione dei campioni differiscono a seconda della loro origine.

Campioni Provenienti dal Reparto (Interni)

I campioni prelevati dai pazienti ricoverati vengono raccolti dall'infermiere e conservati in provette sterili contenenti citrato di sodio. Questo anticoagulante agisce legandosi agli ioni calcio, che hanno lo scopo di attivare la cascata coagulativa. In questo modo, il citrato di sodio impedisce la formazione di fibrina in modo che non si formi un coagulo stabile.

Le provette che in laboratorio vengono utilizzate per la valutazione della coagulazione sono facilmente identificabili perché sono contraddistinte da un tappo di colore celeste. Tuttavia, in commercio sono presenti differenti provette che differiscono per i volumi di sangue e anticoagulanti che possono contenere. Le più utilizzate nei laboratori analisi sono sicuramente quelle che hanno una capacità di anticoagulante compresa tra 0,25mL e 0,5 mL di citrato di sodio, e una capacità di campione variabile tra 2,25 mL e 4,5mL.

Questi campioni non sono stati utilizzati per la determinazione dell'INR tramite il sistema POCT.

Campioni Provenienti dal Front Office (Esterni)

Per i pazienti esterni il processo è leggermente più complesso e legato strettamente ad una lunga pratica burocratica. Il paziente si presenta al front office munito di ricetta dematerializzata la quale viene consegnata al personale di segreteria che attraverso l'utilizzo di un lettore barcode registra i dati anagrafici del paziente nel sistema gestionale.

Al paziente viene consegnato il modulo per il trattamento dei dati personali e per il rispetto della privacy.

I dati anagrafici del paziente vengono inseriti nel sistema gestionale del laboratorio che ha il compito di generare delle etichette che garantiscono l'identificazione univoca del paziente. In queste etichette verranno riportati sia i dati anagrafici del soggetto sia gli esami che deve svolgere. Dopo aver completato l'iter burocratico, al paziente viene assegnato un numero e viene invitato ad attendere il proprio turno in sala d'attesa.

Il sangue prelevato viene conservato in una provetta contenente citrato di sodio, anch'essa contrassegnata con un'etichetta per assicurare l'identificazione corretta del paziente.

Per i pazienti TAO il prelievo viene eseguito tramite prelievo capillare, solitamente il sangue viene prelevato dal polpastrello del dito e processato tramite POCT.

Processazione del Campione in Laboratorio

Una volta inviato il prelievo al laboratorio, il campione viene sottoposto a un processo di centrifugazione. Questa procedura separa i vari componenti del sangue, poiché la valutazione della coagulazione deve essere effettuata sul plasma. La centrifugazione consente di ottenere il plasma, che sarà utilizzato per le analisi di coagulazione, garantendo risultati accurati ed affidabili.

La centrifuga è uno strumento fondamentale nei laboratori in cui vengono svolte le analisi cliniche ma anche nei laboratori di biologia e biochimica. Viene ampiamente utilizzata in laboratorio per la separazione di diverse componenti di un campione in base alla loro densità. Questo processo sfrutta la forza centrifuga generata dalla rotazione ad alta velocità, che spinge le particelle più dense nel fondo del contenitore, separandole dalle componenti meno dense. In un laboratorio in cui si svolgono analisi cliniche, la centrifugazione è fondamentale per la separazione degli emocomponenti, come il plasma, il siero e le cellule del sangue.

Definizioni e caratteristiche dei sistemi POCT

Negli ultimi anni stanno prendendo campo nuovi strumenti che prendono il nome di Point of Care Testing (POCT). Con il termine POCT si intendono una serie di analisi diagnostiche che vengono eseguite grazie all'utilizzo di dispositivi che hanno la capacità di fornire risultati altamente attendibili in tempi relativamente brevi. Questi test non solo sono altamente affidabili ma permettono diagnosi in qualsiasi condizione ci troviamo, per esempio possono essere utilizzati anche a casa in modalità autonoma da parte del paziente evitando il ricorso ai tradizionali test di laboratorio, un esempio è rappresentato dai glucometri che vengono utilizzati dai pazienti per l'autocontrollo del livello di glicemia.

I POCT possono essere fondamentali per alleggerire il carico di lavoro dei laboratori analisi se si considera che il 70-80% delle diagnosi cliniche si basano su esami di laboratorio, ne è stata la prova la recente pandemia da COVID-19 dove i POCT hanno svolto un ruolo cruciale nella diagnosi fornendo risultati in tempistiche altamente brevi.

I test di Point Of Care Testing (POCT) sono eseguiti utilizzando strumenti diagnostici portatili, trasportabili o palmari.

Il POCT rappresenta un modello organizzativo decentralizzato all'interno della Medicina di Laboratorio ma è importante sottolineare che esso deve essere visto come un test complementare, piuttosto che sostitutivo, ai tradizionali test di laboratorio analisi. Per questo i test POCT dovrebbero essere utilizzati solo quando i servizi di laboratorio non

sono accessibili o non possono fornire risultati in tempi adeguati alle necessità cliniche del paziente.

Dato che i risultati ottenuti mediante POCT entrano a far parte della cartella clinica del paziente è fondamentale che vengano garantite prestazioni di alto livello.

I dispositivi POCT possono essere impiegati in una vasta gamma di contesti, sia clinici che non clinici. Troviamo applicazioni nell'ambito domestico, in ambulatori, nei reparti di pronto soccorso e nei reparti specializzati per il contenimento di malattie infettive. Inoltre, questi strumenti sono utilizzati in situazioni di emergenza, come nelle ambulanze, nei centri militari, a bordo di navi da crociera e perfino in aree di incidenti. Numerose sono, inoltre, le figure professionali abilitate all'uso dei POCT, tra questi possiamo distinguere: Tecnici di Laboratorio Biomedico, Medici, Pediatri ed infermieri.

L'utilizzo dei sistemi di Point Of Care Testing (POCT) è strettamente riservato al personale sanitario che ha completato un adeguato percorso formativo, questo processo di formazione deve essere certificato dallo specialista della ditta fornitrice degli strumenti. Questa formazione è essenziale per garantire che l'operatore sanitario sia pienamente competente nell'uso dei dispositivi POCT.

Il personale addestrato deve lavorare in conformità con le procedure standardizzate relative alla manutenzione dei dispositivi, all'esecuzione delle analisi e ai Controlli di Qualità Interni (CQI) ed è fondamentale che queste procedure siano seguite per assicurare la qualità e l'affidabilità dei risultati diagnostici.

L'addestramento prevede la formazione di tutto il personale sanitario attraverso sessioni di formazione che prendono il via una volta che i dispositivi sono installati nel reparto di appartenenza, questi corsi hanno il compito, come detto in precedenza, di fornire al sistema sanitario personale altamente formato e che sia in grado di condurre una analisi in modo sicuro ed efficace.

La formazione di base per l'utilizzo dei dispositivi POCT deve essere continuamente aggiornata attraverso corsi di aggiornamento specifici, che possono includere la partecipazione a corsi ECM (Educazione Continua in Medicina) sia in presenza che a

distanza (FAD). Questi programmi devono coprire una serie di argomenti fondamentali, tra cui:

- Istruzioni sulla sicurezza e sui principi di funzionamento dei dispositivi POCT.
- Istruzioni operative per l'uso corretto e le limitazioni nell'impiego degli strumenti.
- Interpretazione accurata dei risultati diagnostici.
- Revisione, comprensione e risoluzione dei messaggi di errore.
- Procedure per la calibrazione dei dispositivi e l'analisi dei controlli di qualità.
- Mantenimento della documentazione adeguata.
- Preparazione del paziente per l'esecuzione del test e raccolta corretta del campione.
- Registrazione accurata dei risultati del paziente e degli eventuali incidenti avversi.

Gli strumenti che vengono utilizzati per eseguire questo tipo di analisi devono rispettare dei requisiti ben specifici, tra questi ci sono: automatismo completo, manipolazione minima del campione, dimensioni ridotte e una semplice manutenzione; garantendo pur sempre una qualità analitica certificata da Controlli di Qualità Interni (CQI) e la Verifica Esterna di Qualità (VEQ).

Inoltre, questi dispositivi devono essere interfacciabili con il software gestionale del Laboratorio Informatico (LIS), per consentire al personale medico la visualizzazione in tempo reale dei risultati.

Le principali caratteristiche che i sistemi analitici POCT devono possedere includono:

- Esattezza e precisione analitica; I dispositivi POCT devono garantire prestazioni analitiche che siano pressoché uguali a quelle che si ottengono nei tradizionali laboratori di analisi assicurando che i risultati siano affidabili e precisi;
- Riduzione dell'errore da parte dell'operatore; I sistemi POCT devono essere progettati per minimizzare gli errori operativi attraverso comandi semplici e intuitivi, segnalazioni automatiche in caso di errori da parte dell'operatore, e meccanismi di autodiagnosi.
- Assenza di trattamento preanalitico; Le apparecchiature POCT devono operare senza richiedere alcun trattamento preanalitico del campione, come centrifugazione o diluizione, per semplificare il processo e ridurre il rischio di errore.
- Memorizzazione e archiviazione dei dati; I sistemi devono essere in grado di memorizzare e archiviare i dati dei pazienti e i risultati dei test per garantire la tracciabilità e la documentazione completa delle analisi effettuate.
- Stampa dei risultati; È importante che le apparecchiature POCT offrano la possibilità di stampare i risultati, per facilitarne la consultazione immediata e la registrazione cartacea.
- Gestione del controllo di qualità; I dispositivi devono avere la capacità di gestire i controlli di qualità memorizzando i dati relativi e indicare quando un valore fuoriesce dal limite accettabile.

I dispositivi POCT sono ormai ampiamente diffusi a livello globale e giocano un ruolo essenziale nell'organizzazione dei servizi di salute pubblica. Quando utilizzati

correttamente, questi strumenti possono essere estremamente efficaci nel migliorare le cure cliniche fornite ai pazienti.

In situazioni di emergenza e nelle sale operatorie, i dispositivi POCT sono particolarmente preziosi, ad esempio, nei pazienti con sospetto di ictus, l'impiego di un dispositivo POCT per la misurazione del tempo di protrombina (PT) e dell'indice internazionale normalizzato (INR) consente di valutare rapidamente le capacità coagulative del paziente, permettendo un trattamento tempestivo. Allo stesso modo, durante interventi chirurgici complessi, come la chirurgia cardiaca o i trapianti d'organo, i POCT sono utilizzati per monitorare in tempo reale le condizioni del paziente, garantendo una gestione clinica ottimale e sicura.

Questi esempi evidenziano come i POCT, grazie alla loro rapidità e precisione, siano strumenti indispensabili non solo per la gestione quotidiana delle malattie croniche, ma anche per interventi medici critici e di emergenza, contribuendo così in maniera significativa alla qualità e all'efficacia delle cure sanitarie.

Vantaggi dei sistemi POCT

I principali vantaggi dei dispositivi POCT risaltano all'occhio quando i risultati delle analisi vengono direttamente inseriti nella cartella clinica elettronica del paziente agevolando di molto tutti i membri del personale medico, i quali, hanno una immediata disponibilità dei risultati riducendo di molto il così detto "turn around time o TAT; ovvero, il tempo che intercorre tra la richiesta del test e l'ottenimento del risultato e la conseguente risposta clinica.

L'ottimizzazione del TAT è fondamentale e un recente studio ha confermato che l'utilizzo di questi POCT e una cartella clinica elettronica può portare ad una forte diminuzione

della mortalità grazie alla rapidità con cui si ottengono i risultati e le tempistiche in cui questi vengono comunicati.

Svantaggi dei sistemi POCT

Sebbene la maggior parte dei dispositivi POCT siano progettati per essere semplici da utilizzare e con un margine di errore limitato, non sono completamente privi di possibilità di errore. Pertanto, è essenziale che sia i pazienti sia gli operatori sanitari che utilizzano questi dispositivi ricevano una formazione adeguata sul loro corretto utilizzo. In particolare, alcuni test POCT, come quelli impiegati per determinare variazioni nel dosaggio terapeutico dei farmaci, possono avere conseguenze significative se utilizzati in modo improprio.

In generale, i POCT devono essere considerati come strumenti clinici validi e utili, ma non come l'unica soluzione diagnostica disponibile. È fondamentale che questi test siano utilizzati in modo coordinato con i test di laboratorio tradizionali, piuttosto che in loro sostituzione

Sistema analitico qLabs Micropoint

Il sistema analitico qLabs PT/INR è utilizzato per la misurazione quantitativa del tempo di protrombina (pT) in campioni di sangue intero provenienti da prelievo capillare o venoso. Questo sistema è composto da un elettrometro (ElectrMeter) e da strisce reattive.

Il test viene condotto semplicemente inserendo una striscia reattiva all'interno di un apposito alloggiamento, successivamente questa striscia viene riscaldata fino ad arrivare a una temperatura preimpostata, una volta raggiunta la corretta temperatura viene aggiunta una

goccia di sangue che grazie alla presenza di appositi canali scivola fino a raggiungere due zone ben precise: una zona rappresenta l'area del test mentre l'altra zona rappresenta l'area di controllo.

In queste due aree, il sangue viene miscelato con dei reagenti ed inizia a coagulare. La rilevazione è resa possibile grazie alla presenza di due elettrodi in ogni area, ai quali viene fornita tensione costante. Quindi, mentre il sangue inizia a coagulare la corrente che viene monitorata dai due elettrodi cambia individuando variazioni di corrente nella zona del test e del controllo.

Lo strumento produrrà poi un risultato espresso in INR con valori compresi tra 0.8 e 8.0. I valori al di fuori del range non vengono visualizzati nello strumento.



Figura 8. Micropoint-qLabs

Sistema analitico Xprecia Stride

Anche in questo sistema analitico si utilizzano delle particolari strisce reattive, le quali sono dotate di una apposita estremità ove è presente una zona in cui avviene la reazione vera e propria. Per iniziare il test, viene inserita l'estremità della striscia all'interno dello strumento, viene poi applicata una goccia di sangue intero sulla striscia che grazie al fenomeno della capillarità inizierà a diffondersi fino ad arrivare all'estremità in cui avviene la reazione.

Quando lo strumento rileva che il sangue è coagulato il test si arresta grazie al principio del sistema elettrochimico producendo un risultato visibile sul display dello strumento stesso. Il valore del tempo di protrombina (pT) viene espresso in INR o in secondi (sec). Il range di segnalazione è compreso tra 0.8 ed 8.0, quindi, i valori che superano questa soglia non vengono visualizzati.



Figura 9. Strumento Xprecia Stride

RISULTATI

Prima di svolgere il test è stata stimata la precisione degli strumenti attraverso controlli liquidi certificati (LQCPT 1 ed LQCPT 2) e su pazienti sani. Sono stati presi in considerazione due range di INR:

1. $1.0 < \text{INR} < 2.0$;
2. $2.0 < \text{INR} < 3.0$.

I risultati sono stati espressi dopo sei misure ripetute per ogni campione.

Dalla letteratura si evince che il sistema Xprecia Stride non può essere utilizzato per analizzare pazienti sottoposti a terapia con eparina perché è stato dimostrato che i risultati ottenuti da prelievo di sangue venoso possono essere falsamente bassi rispetto a quelli ottenuti da prelievo di sangue capillare, per questo motivo sono stati selezionati solo pazienti che svolgevano terapia con anticoagulante con Dicumarolici come: Warfarin, Coumadin, Acenocumarolo e Sintrom.

Per l'analisi statistica dei dati viene utilizzato un software dedicato.

Allo studio hanno aderito 165 pazienti in terapia con Warfarin, di questi 165 pazienti possiamo distinguere:

- 67 femmine;
- 98 maschi.

Con età compresa tra i 50 e i 92 anni e con età media di 77,4 anni.

Questi pazienti sono stati seguiti per sei settimane e l'analisi è stata condotta con cadenza settimanale in duplicato su entrambi i POCT andando poi a confrontare i rispettivi delta (differenza delle medie).

Il grado di correlazione delle due misurazioni è stato stimato anche suddividendo la casistica per range di INR, quindi, è stata valutata la relazione nei seguenti sottogruppi:

- $\text{INR} > 2$; in questo gruppo sono presenti 41 pazienti;
- $2.0 < \text{INR} < 3.0$; in questo gruppo sono presenti 103 pazienti;
- $\text{INR} > 3$; in questo gruppo sono presenti 21 pazienti.

CONCLUSIONI

La comparazione dei due diversi sistemi ha portato alla conclusione che vi è una correlazione piuttosto significativa, soprattutto nel range terapeutico. Questa diretta correlazione tende a diminuire con valori di INR maggiori di 3, come riportato anche dalla letteratura.

Inoltre, è stato evidenziato che i pazienti monitorati con POCT tendono a manifestare meno eventi avversi rispetto ai pazienti monitorati con i sistemi tradizionali.

Questi risultati ci dimostrano come i sistemi POCT possono essere una buona alternativa ai classici test di laboratorio; tuttavia, la diagnosi di laboratorio non potrà mai essere sostituita dai test POCT.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Bertini M., Corrente F., Rocchi M., Frattolillo D., Pierandrei S., Antonelli M., Puzzolo M.C., Piane D., Vitillo M. Test aPTT: correlazione Cephascreen vs PTT-Autoamte (STAGO) e nuovi range nella terapia eparinica infusioneale.
- Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. Point-of-Care Testing of International Normalized Ratio for patients on oral anticoagulant therapy: systematic review and economic analysis. Ottawa: The Agency; 2014 Jul. (CADTH Optimal Use Report; vol.3 no. 1b).
- Crickshank MK, Levine MN, Hirsh J, et al. Astandard heparin normogram for the management of heparin therapy. Arch Intern Med 1991;151:333-7.
- David Wild. Point of Care Testing: Making innovation work for patient-centered care. Ed. AACCC Press, 2021
- Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American college of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines
- Giovanna Caliendo. Diagnostica di laboratorio: Principi ed applicazioni. Ed. McGraw-Hill, 2015
- Giuseppe Lippi, Mario Plebani. Fisiopatologia Clinica: Emostasi e Trombosi. Ed. Piccin, 2010
- Heneghan *et al.* Self-monitoring of oral anticoagulation: a systematic review and meta-analysis. Lancet 2006; 367:404-11.
- <http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/2027.42/74583/1/j.1538-7836.2008.03224.x.pdf>
- <https://anticoagulazione.it/?p=1061>
- <https://labtestsonline.it/approfondimenti/poct-point-of-care-test.html>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315264/>

- https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf5/K053111.pdf
- <https://www.valorinormali.com/coagulazione/>
- Mario Cazzola, Fabrizio Pane, Giuseppe Saglio. Ematologia: Patogenesi, Diagnosi e Terapia. Ed. Elsevier, 2018.
- Peter Lupp, Ralf Junker: Point of Care Testing: Principles and clinical applications. Ed. Springer, 2018
- Pier Mannuccio Mannucci. Malattie della coagulazione. Ed. McGraw-Hill, 2012
- Quality assessment in point-of-care coagulation testing Dianne P kitchen, Steve Kitchen, Ian Jennings, Tim Woods, Isobel Walker Affiliations expand, PMID: **19085765**, DOI: 10.1055/s-0028-1104543
- Trombosis Research n 156, 2017, 51-57. (Precision and accuracy of the new XPrecia Stride mobile coagulometer). R. Galeazzi, F. Piacenza, A. Marziali, G. Profili, A. Galizia, R. Maraschio, G. Santilli, A. Castrignano, S. Appolloni, S. Giovagnetti, F. Moroni, F. Marchegiani