

Studi e ricerche

Una metodica automatica per la determinazione del tempo di lisi delle euglobuline

A. CRAVERI - P. M. MANNUCCI
D. MARI - G. P. BOSSI

*Istituto di Patologia Speciale Medica I
Centro per lo Studio e la Terapia
delle Malattie Emorragiche e della Trombosi
dell'Università di Milano*

(Direttore: Prof. N. Dioguardi)

RIASSUNTO. — Vengono studiate le condizioni metodologiche più idonee per l'esecuzione del tempo di lisi delle euglobuline per applicare questo test a un apparecchio che permette la registrazione contemporanea ed automatica e la definizione del punto finale della lisi di 12 coaguli.

Si descrive infine la tecnica che si è dimostrata più idonea.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI. — Euglobuline.

La fibrinolisi si determina per l'azione sul coagulo di fibrina di un enzima proteolitico, la plasmina. La plasmina esiste in circolo sotto forma di un precursore inattivo, il plasminogeno che può essere convertito in plasmina mediante attivatori diretti o per l'azione di un proattivatore che si trasforma in attivatore per l'azione di varie chinasi.

Per la determinazione dell'attività fibrinolitica esistono diversi metodi, ma nessuno di essi ha dato risultati completamente soddisfacenti.

Uno dei metodi più diffusi per lo studio della fibrinolisi è il metodo delle piastre alla fibrina di Astrup e Mullerzt (1952). Il metodo è basato sull'impiego della fibrina come substrato e sulla valutazione dell'entità della lisi, prodotta dal precipitato euglobulinico del plasma, dopo un tempo fisso di incubazione.

Con questo metodo è possibile lo studio separato della plasmina e del plasminogeno in quanto la prima è espressa dall'attività litica spontanea del plasma in esame, mentre il secondo è misurato indirettamente mediante la sua conversione totale in plasmina usando quantità ottimali di streptochinasi.

Perché il metodo dia risultati attendibili sono necessari diversi accorgimenti: tutto il

materiale deve essere previamente sterilizzato col calore; le piastre di fibrina devono essere mantenute, mentre coagulano, su un piano perfettamente orizzontale; fino alla formazione del precipitato euglobulinico si deve procedere a freddo; le piastre devono essere riscaldate a 85° per 30 minuti per distruggere gli inibitori e il plasminogeno presente nel fibrinogeno usato; si devono misurare solo gli aloni di lisi rotondi tralasciando quelli simmetrici dovuti al rotolamento delle gocce. La lettura delle aree di lisi viene fatta dopo incubazione delle piastre per oltre 20 ore a 37°; quindi il metodo presenta dei limiti oltre che per le diverse possibilità di errore, come si arguisce dagli accorgimenti più sopra elencati, anche per l'eccessiva lunghezza del tempo occorrente.

Altri metodi comunemente usati sono quelli che si basano sull'osservazione del tempo di lisi del coagulo ottenuto dal sangue in toto diluito (DBCLT) (Fearnley, MacFarlane e Pilling, 1947) o dalla frazione euglobulinica del plasma (TLE). La frazione euglobulinica, che viene ottenuta diluendo e acidificando il siero o il plasma, contiene praticamente tutto il plasminogeno e l'attivatore del plasminogeno, mentre il contenuto di fibrinogeno è circa un quarto di

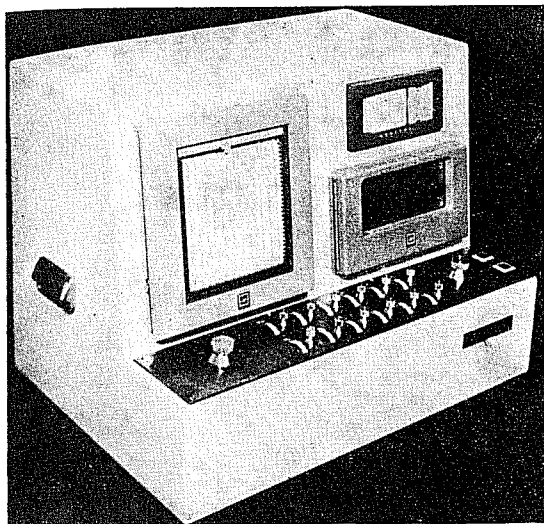


Fig. 1. — Euglobulin Clot Lysis Time Recorder.

(Fornito da Scottish Industrial Export Group; Gilkemyr House; 561 Gow Road; Glasgow G 11 7 DH; United Kingdom).

quello del plasma nativo. Gli inibitori dell'attivatore del plasminogeno e della plasmina rimangono nel sovrantante per cui il test viene considerato una misura dell'attivatore ematico del plasminogeno senza l'influenza degli inibitori.

Gli inconvenienti di questi metodi sono la tediosità dell'osservazione continua del coagulo e la difficoltà di obiettivare il punto finale corrispondente alla lisi completa. E' necessario inoltre riprodurre con estrema meticolosità le modalità di effettuazione del test per raggiungere una corretta riproducibilità dei dati sempre difficile da ottenere.

Per questi motivi abbiamo studiato le condizioni metodologiche per una tecnica semplice e riproducibile applicata ad un apparecchio a canali multipli che consente la registrazione continua ed automatica e la precisa definizione del punto finale del tempo di lisi delle euglobuline.

Materiali e metodi

Registratore automatico. (Euglobulin Clot Lysis Recorder) (fig. 1 e 2).

Il principio su cui è basato l'apparecchio è quello della densitometria: quando la frazione euglobulinica coagula si ha un aumento della densità ottica, che poi diminuisce progressivamente fino a raggiungere

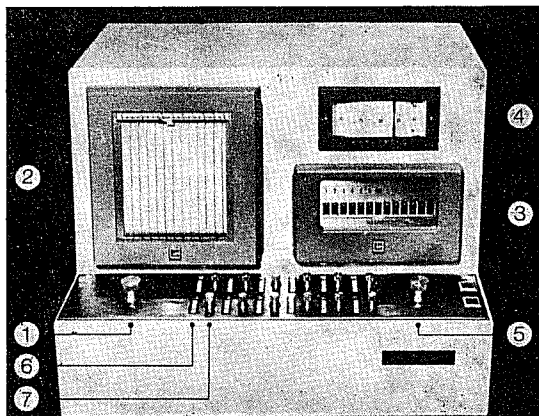


Fig. 2. — 1) *Inseidiamento del campione.* - Il castello è montato integralmente nell'apparecchiatura. I fori di inseidiamento sono numerati singolarmente in modo da corrispondere al diagramma del registratore. - 2) *Registratore dei diagrammi dei vari campioni.* - Sono possibili variazioni nella velocità della carta. Ogni campione viene registrato ogni 18 secondi se sono utilizzati tutti e dodici i canali. - La velocità della carta è stata calcolata per fornire un diagramma continuo di ogni campione. - 3) *Selettore di canale.* - Qualsiasi campione o tutti i campioni possono essere registrati. Le posizioni dei campioni non utilizzati possono essere disinserite con una riduzione di un secondo per punto nel ciclo di stampa. Se lo si desidera, un solo campione può essere rilevato continuamente con una registrazione a stampa ogni 7 secondi. - 4) *Termostato regolabile.* - La temperatura è mantenuta a 37° C. - 5) *Contatempo automatico.* - 6) *Comando di sensibilità.* - Il segnale di ogni provetta è regolabile su una scala tarata verticalmente. - 7) *Comando di azzeramento.* - Permette di mettere ogni campione nella posizione voluta sul foglio di registrazione.

i valori minimi quando il coagulo si dissolve.

Il circuito misuratore rivela, attraverso una fotocellula, i cambiamenti di densità ottica del campione, e li trasmette amplificati ad un registratore a punti multipli.

Lo strumento è costruito in modo da misurare e registrare contemporaneamente fino a 12 campioni. La camera di lisi è mantenuta a 37° C attraverso un termostato regolabile. Vi è un comando di sensibilità, che permette di variare la deflessione del tracciato per una data densità ottica, e un comando di azzeramento che permette di disporre ogni campione nella posizione voluta sul grafico di registrazione.

Esiste la possibilità di interrompere automaticamente la registrazione dopo un tempo desiderato premendo un apposito pulsante e regolando un contatempo.

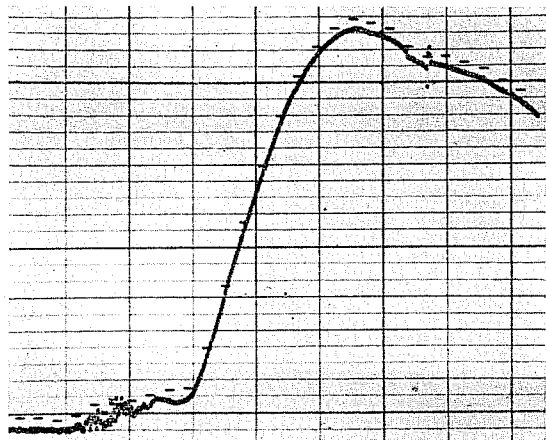


Fig. 3. — Tracciato del tempo di lisi di un campione euglobulinico (da destra a sinistra).

Preparazione del plasma.

Il sangue veniva prelevato il mattino tra le 11 e le 12,30 a personale di laboratorio di età compresa fra 18 e 30 anni; i soggetti venivano mantenuti in condizione di riposo per 30 minuti prima del prelievo, che veniva effettuato con minima stasi dalle vene del braccio, con siringhe di plastica e aghi siliconati. Il sangue veniva versato in provette di plastica contenenti citrato trisodico 3,8 % e centrifugato a 4° per 10 minuti a 2000 g ottenendo plasma povero in piastrine. La preparazione della frazione euglobulinica ve-

niva in ogni caso effettuata entro 30 minuti dal prelievo mantenendo il plasma a 4° C (in ghiaccio fondente).

Preparazione della frazione euglobulinica.

Due metodi venivano impiegati: quello di Milstone (1941) in cui l'acidificazione del plasma e la precipitazione della frazione euglobulinica venivano ottenute con acido acetico, e quello di Von Kaulla e Schultz (1958) che impiega per questi scopi l'amidride carbonica.

Metodo di Milstone. - 1 ml di plasma veniva mescolato con 8,7 ml di H₂O distillata fredda e con 0,3 ml di acido acetico 1,3 %. La miscela veniva lasciata a 4° C per 10 minuti e il precipitato separato per centrifugazione a 2000 g per 5 minuti.

Metodo di Von Kaulla. - 1 ml di plasma veniva mescolato con 9 ml di H₂O distillata fredda in una beuta; si esponeva in seguito per due minuti la miscela a un getto di CO₂ e si separava il precipitato per centrifugazione come sopra.

Determinazione del tempo di lisi.

Il sovranatante veniva scartato in entrambi i metodi, procedendo poi ad asciugare accuratamente con carta da filtro la superficie interna della provetta. Il preparato veniva quindi sciolto in 2 ml di tampone fo-

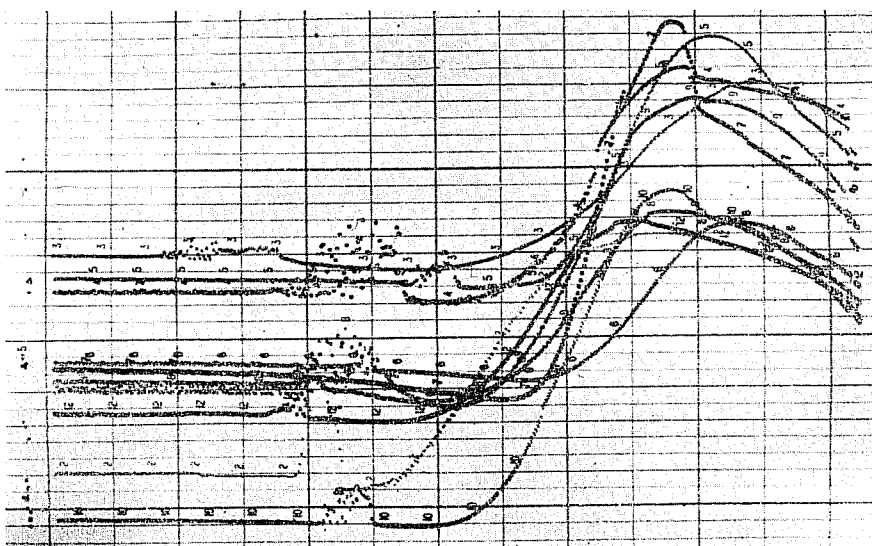


Fig. 4. — Tracciato del tempo di lisi di 8 campioni euglobulinici.

sfato isotonic pH 7,5. 0,4 ml della sospensione venivano mescolati, in una provetta di vetro adattabile all'apparecchio (10 × 75 mm) con 0,1 ml di trombina bovina ricostituita con H₂O distillata (60 Unità N.I.H./ml). Dopo l'avvenuta formazione del coagulo, la provetta veniva collocata in uno dei canali dell'apparecchio, iniziando la registrazione.

Con il tipo di coagulo ottenuto con i metodi di precipitazione da noi usati, la sensibilità dell'apparecchio deve essere regolata ai valori minimi, perchè in caso di coaguli molto densi, la differenza di densità ottica fra il coagulo non lisato e il coagulo lisato è tale che il tracciato di registrazione esce dalla scala.

La registrazione viene iniziata premendo gli interruttori dei canali. Si rileva allora una lieve ascesa della curva (fig. 3 e 4) che, dopo un tempo variabile, raggiunge un plateau ed inizia a scendere quando il coagulo tende a lisare.

Osservando visualmente il coagulo, questa fase di discesa del tracciato corrisponde alla progressiva retrazione verso l'alto del coagulo.

Quando il coagulo è completamente retratto e ridotto ad una sottile pellicola alla superficie, il tracciato può diventare orizzontale. Il punto finale è però rappresentato dall'interruzione della linearità del tracciato e dalla comparsa in esso di alcuni punti sparsi, che dopo breve tempo confluiscono di nuovo in una linea continua (fig. 3 e 4).

Il fenomeno corrisponde alla lisi completa del coagulo, i cui frammenti prima di sedimentare, passano davanti al raggio luminoso interrompendo la regolarità della registrazione. Consideriamo questo il punto finale.

Studio metodologico

Alcune caratteristiche metodologiche necessarie per la corretta esecuzione del tempo di lisi delle euglobuline sono il mantenimento a bassa temperatura del prelievo fino al momento della coagulazione della frazione euglobulinica e l'impiego del tampone fosfato per risospendere la frazione euglobulinica e del citrato trisodico 3,8 % come anticoagulante.

Questi elementi sono stati già stabiliti (Chakrabarti ed al., 1968) e quindi applicati direttamente nel presente metodo. Abbiamo

invece ritenuto opportuno indagare altri elementi in rapporto all'automatizzazione del metodo con il Euglobulin Clot Lysis Recorder.

Effetto del metodo di precipitazione.

Dallo stesso campione di plasma si ottenevano 4 precipitati euglobulinici con il metodo di Milstone impiegando l'acido acetico, e altri 4 con il metodo di Von Kaulla e Schultz.

I risultati sono riportati nella tabella 1. E' evidente un'assai maggiore riproducibilità col secondo metodo rispetto al primo.

TABELLA 1. — Variabilità del tempo di lisi delle euglobuline (espresso in minuti) in rapporto al metodo di precipitazione.

Metodo di Milstone (acido acetico)	Metodo di Von Kaulla e Schultz (CO ₂)
180	150
90	165
120	160
140	150

Effetto del volume della sospensione euglobulinica.

Da uno stesso campione di plasma venivano ottenuti sei precipitati euglobulinici con il metodo di Von Kaulla e Schultz, che venivano ricostituiti in doppio con rispettivamente 1, 2 e 3 ml di tampone fosfato. Dai risultati (tabella 2) appare che con i maggiori volumi il tempo di lisi risulta accorciato: veniva scelto il volume di 2 ml perchè dava un coagulo di densità ottica idonea per le caratteristiche ottiche dell'apparecchio.

TABELLA 2. — Effetto del volume della sospensione euglobulinica sul tempo di lisi (espresso in minuti).

Campione	T. Fosfato, 1 ml	T. Fosfato, 2 ml	T. Fosfato, 3 ml
1	150	120	105
2	140	125	105

Valori normali.

Per ottenere i limiti fiduciali del metodo, sono stati indagati 49 soggetti (28 maschi e 21 femmine). Essi erano medici, studenti, o personale di laboratorio, non soffrivano apparentemente di alcuna forma morbosa ed avevano un'età media di 24 anni (limiti estremi 18-38 anni). I valori in minuti del tempo di lisi delle euglobuline (TLE) sono riportati nella tabella 3 e rappresentati in un diagramma classi-frequenza nella fig. 5.

Si può rilevare la notevole dispersione dei valori espressi in minuti (media: 136,00; dev. standard 71,73; limiti estremi: 55-340) e l'assenza di normalità della distribuzione della popolazione. La distribuzione non poteva venire normalizzata nemmeno effettuando alcuni tipi di trasformazione dei dati (logaritmi, radici quadrate, reciproci).

Data la natura del dato, si è rinunciato a ottenere dei limiti fiduciali basati sul-

l'ipotesi di distribuzione normale dei dati; si utilizzavano pertanto come limiti il valore più basso ed il più alto registrato, tenendo presente che con un campione di queste dimensioni vi è la probabilità del 90 % che tali limiti racchiudano il 90 % della popolazione.

Non si registrava una differenza significativa fra i maschi e le femmine.

Variabilità metodologica.

Da un campione di plasma veniva ottenuto con una sola preparazione il precipitato euglobulinico, che veniva diviso in 10 campioni, in cui il TLE veniva determinato contemporaneamente all'apparecchio. Il valore medio era di 93 minuti (tab. 4); la deviazione standard 7 minuti.

Da un campione di plasma il precipitato euglobulinico veniva ottenuto contemporaneamente con preparazioni diverse; il TLE veniva determinato all'apparecchio nei 7 campioni. Il valore medio era 262,8 minuti,

TABELLA 3. — Tempo di lisi delle euglobuline (espresso in minuti) in 49 soggetti normali.

Maschi		Femmine	
	230		125
	78		125
	72		95
	70		280
	90		105
	150		55
	68		180
	135		110
	60		120
	150		205
	114		100
	280		165
	135		245
	85		75
	335		85
	80		100
	70		70
	62		185
	115		90
	90		90
	190		195
	160		
	90		
	200		
	340		
	175		
	60		
	180		
Media	149.9	Media	132.6
D.S.	106.9	D.S.	61.7
	Media generale		136.0
	D.S.		71.7
	Limiti		55-340

TABELLA 4. — Variabilità dello stesso precipitato euglobulinico.

Campione	Tempo di lisi, minuti	
1	95	
2	105	
3	90	
4	80	
5	90	
6	95	
7	90	
8	100	
9	90	
10	100	
	Media	93.5
	D. S.	7.0

TABELLA 5. — Variabilità di precipitati euglobulinici ottenuti dallo stesso plasma.

Campione	Tempo di lisi, minuti	
1	250	
2	245	
3	245	
4	250	
5	280	
6	280	
7	290	
	Media	262.8
	D. S.	19.5

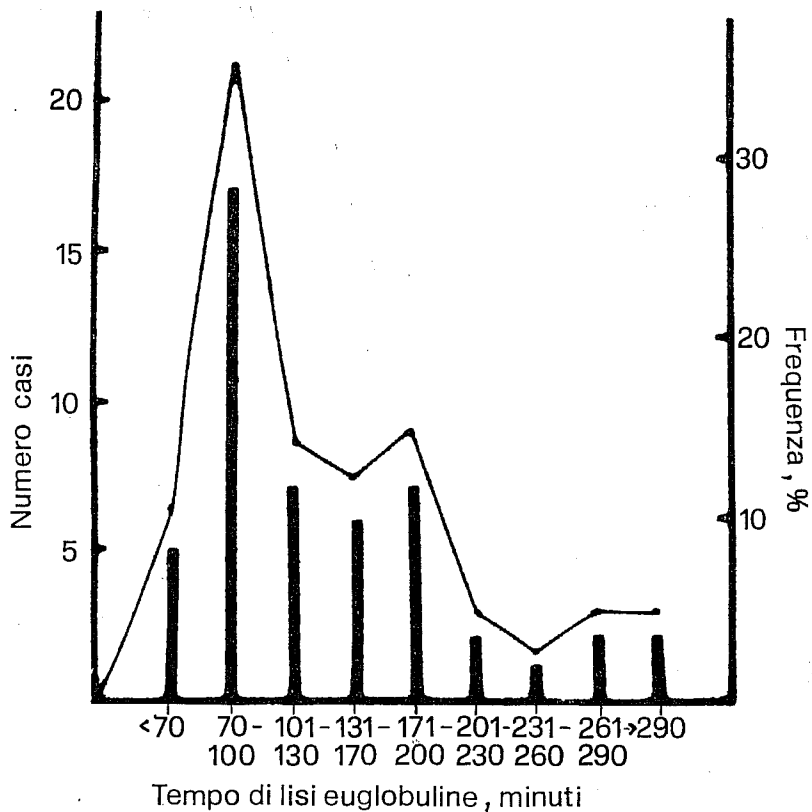


Fig. 5. — Distribuzione per classi di frequenza (linea continua) del tempo di lisi delle euglobuline in 49 soggetti normali di ambo i sessi.

con una deviazione standard di 19,5 minuti (tab. 5).

Da uno stesso soggetto si preparava il precipitato euglobulinico in 6 giorni differenti e in ogni occasione si determinava all'apparecchio il TLE. Il valore medio era di 288,3 minuti (tab. 6), con una deviazione standard di 104,5.

TABELLA 6. — Variabilità del precipitato euglobulinico ottenuto in diverse giornate dallo stesso soggetto.

Campione	Tempo di lisi, minuti
1	230
2	220
3	180
4	380
5	450
6	270
Media	288.3
D.S.	104.5

Commento conclusivo

Le più importanti fonti di variabilità del TLE sono un prelievo scorretto, la mancata osservazione della tecnica delle basse temperature e delle caratteristiche delle superfici con cui viene raccolto il sangue e preparato il plasma e la frazione euglobulinica (Chakrabarti e Coll., 1968). Inoltre è assai importante la tecnica usata per la precipitazione euglobulinica; abbiamo visto a questo proposito che la tecnica di Von Kaulla, in cui si utilizza il CO₂, dà risultati più riproducibili di quella di Milstone che impiega l'acido acetico.

Con questi accorgimenti il TLE è molto riproducibile e dà, nei soggetti normali adulti, valori compresi tra 55 e 340 minuti. Inoltre l'apparecchio di registrazione automatica presenta dei notevoli vantaggi, risparmiando la tediosa procedura di dover osservare il coagulo a frequenti intervalli e la difficile definizione del punto finale; permette poi, registrando simultaneamente la

lisi di 12 coaguli, di essere utilizzato in medicina preventiva in un programma di ricerca sui fattori di rischio trombotico.

Dallo studio della variabilità del metodo appare che l'errore metodologico legato all'apparecchio e alla preparazione del precipitato euglobulinico è trascurabile; le variazioni riscontrate nello stesso soggetto indagato in condizioni sperimentali comparabili in giorni diversi sono probabilmente legate alle note variazioni fisiologiche da giorno a giorno dell'attività fibrinolitica spontanea.

Tecnica consigliata

Si preleva il sangue senza stasi venosa con siringhe di plastica. Si miscolano 9 parti di sangue con 1 parte di 3,8 % citrato trisodico in una provetta di plastica precedentemente raffreddata a 4° C e mantenuta in seguito sempre in un recipiente con ghiaccio fondente. Si centrifuga immediatamente il sangue a 4° C, 2000 g × 10 minuti. 1 ml di plasma viene aspirato dal sovrantante e mescolato con 9 ml di acqua distillata fredda in una beuta da 50 ml siliconata. Successivamente CO₂ al 5 %, contenuto in una bombola, viene fatto gorgogliare per 2 minuti attraverso un tubo di gomma o plastica sulla superficie liquida, facendo ruotare la beuta. Si noterà la formazione di un precipitato opaco. Da questo momento la tecnica delle basse temperature non è più essenziale.

Si versa la miscela in una provetta di plastica e si centrifuga a 2000 g × 10 minuti. Si getta il sovrantante; si asciugano accuratamente le pareti con carta da filtro da ogni residuo liquido; si scioglie il precipitato con 2 ml di tampone fosfato pH 7,4.

0,4 ml della sospensione sono versati in provette di vetro da sierologia (10 × 75 mm); si aggiunge 0,1 ml di trombina bovina (60 Unità N.I.H./ml). Dopo la formazione del coagulo la provetta viene messa in uno dei canali dell'apparecchio e si inizia a far scorrere la carta, segnando il tempo d'inizio. La sensibilità dell'apparecchio deve essere

ai valori minimi (spostare quasi completamente in senso antiorario il comando corrispondente); si aggiustano poi con la manopola dell'azzeramento i vari campioni nella parte alta del tracciato (valori da 5 a 8 sulla scala della carta di registrazione) e si inizia la registrazione. Il punto finale è rappresentato dalla comparsa di alcuni punti sparsi che interrompono temporaneamente la linearità del tracciato.

SUMMARY

From the 1st Department of Pathology, Centre for the Study and Therapy of haemorrhagic Diseases and Thrombosis (Head: Prof. N. Dioguardi), University of Milan.

A. Craveri, P. M. Mannucci, D. Mari and G. P. Bossi: Automatic method for the determination of euglobulin lysis time. — The methodological conditions employed for the euglobulin lysis time with an automatic instrument have been studied. This allows a continuous automatic recording with precise definition of the end point. The most suitable technique is then fully described.

[« Min. Med. », 64, 4558-4564, (December) — A. Craveri, P. M. Mannucci, D. Mari, G. P. Bossi: « Una metodica automatica per la determinazione del tempo di lisi delle euglobuline »]. Authors' address: A. Craveri - Piazzale G. Cesare, 21 - 20145 Milano (Italy).

BIBLIOGRAFIA

- Astrup T., Mullertz S.: « Fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity ». Arch. Biochem. Biophys., 40, 346, 1952.
- Biggs R., MacFarlane R. G., Pilling J.: « Observations on fibrinolysis. Experimental production by exercise and adrenaline ». Lancet, 1, 402, 1947.
- Chakrabarti R., Bielewicz H. M., Evans J. F., Fearnley G. R.: « Methodological study and a recommended technique for determining the euglobulin lysis time ». J. Clin. Path., 21, 698, 1968.
- Fearnley G. R., Balmforth G., Fearnley E.: « Evidence of a diurnal fibrinolytic rhythm with a simple method of measuring natural fibrinolysis ». Clin. Sci., 16, 645, 1957.
- Milstone H. I.: « A factor in normal human blood which participates in streptococcal fibrinolysis ». Immunology, 42, 109, 1941.
- Von Kaulla K. N., Schultz R. I.: « Methods for the evaluation of human fibrinolysis. Studies with two combined techniques ». Amer. J. Clin. Path., 29, 104, 1958.

[Indirizzo dell'Autore:

A. Craveri
Piazzale G. Cesare 21
20145 Milano]