

◆
Chirurgia

L'APPLICAZIONE DEL PLASMA RICCO DI PIASTRINE IN UN CASO DI PSEUDOTROMBOCITOPENIA EDTA-DIPENDENTE

G. Sammartino*, M. Tia*, A.E. di Lauro*, R. Saviano*, E. D'Agostino**, G. Fratellanza**

* Area Funzionale di Chirurgia Odontostomatologica del Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali dell'Università "Federico II" di Napoli

** Area Funzionale di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale dell'Università "Federico II" di Napoli

PAROLE CHIAVE: Plasma ricco di piastrine, pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente

KEY WORDS: Platelet Rich Plasma, Pseudothrombocytopenia EDTA-dependent

◆ Sommario

Il plasma ricco di piastrine (PRP) è stato utilizzato nel trattamento chirurgico post-estrattivo di una paziente in terapia con anticoagulanti orali e che presentava una pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente. Per un corretto approccio clinico e terapeutico gli Autori dimostrano quanto sia importante la diagnosi differenziale tra le varie forme di piastrinopenia dal momento che nel caso di una pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente le piastrine presentano un falso difetto quantitativo, ma le stesse non mostrano nessuna alterazione qualitativa. La metodica proposta è stata applicata con successo e nessuna complicanza emorragica è insorta dopo le estrazioni dentarie.

◆ Summary

Platelet Rich Plasma (PRP) was utilised in the surgical treatment after tooth extractions of a patient in anticoagulant therapy who showed a pseudothrombocytopenia EDTA-dependent. For a correct clinical and therapeutical approach the Authors prove that it's very important a differential diagnosis between the different forms of thrombocytopenia because in the pseudothrombocytopenia EDTA-dependent the platelets show a spurious quantitative defect, but these don't show any functional alterations. The technique proposed was successful and none haemorrhagic complication occurred after the extractions.

◆ Introduzione

La pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente è un fenomeno per cui la conta piastrinica eseguita con strumentazione automatica risulta essere falsamente più bassa in soggetti con valori normali del numero di piastrine (Blonska & Krol, 2001; Bragnani et al., 2001; Fiorin et al., 1998). Nella maggior parte dei casi tale fenomeno che è EDTA-dipendente e complemento inattivante, è legato ad una bassa concentrazione di EDTA (Etilendiamminotetraacetato) nel sangue incubato al 37°C. L'EDTA è un agente anticoagulante che viene utilizzato per la preparazione di plasma ricco di piastrine (PRP) e per il filtrato di un reattore per la separazione piastrinica (collocazione di i) e i rapporti relativi

Neos.

rubrica delle novità del settore dentale

Prima Edizione: novembre 2000
a cura dell'Autore

NUOVA TAVOLA PERIODICA dei 112 elementi chimici

**Gruppi A (50 elementi)
Barioni nel nucleo a SPIN 1/2**

**Gruppi B (62 elementi)
Barioni nel nucleo a SPIN 3/2**

Il nome in generale delle caselle nere dopo il numero atomico "Z" è dato il numero atomico (Z) la cui cifra finale è uguale a quella della casella immediatamente superiore nel campo della Serie Periodica. Il nome "ne" è dato al numero atomico (Z) la cui cifra finale è uguale a quella della casella immediatamente superiore nel campo della Serie Periodica. Il nome "ne" è dato al numero atomico (Z) la cui cifra finale è uguale a quella della casella immediatamente superiore nel campo della Serie Periodica.

Legend:

- GAS NOBILI
- METALLI ALCALINI
- SEMI METALLI
- NON METALLI
- LANTANIDI
- ATTINIDI

Copyright © 1998 DOTT. MASSIMO CORBUCCI
Riproduzione vietata
DIRITTI RISERVATI ALL'AUTORE AI TERMINI DI LEGGE
Indirizzo dell'Autore:
Dott. Massimo Corbucci, C.P. 47
ITALY - 01102 VITERBO

Cod. ISBN

russe, dove la riuscita dell'impresa era stata dichiarata. L'evidenza che il "nuovo" Sistema Periodico non possa contenere più di 112 elementi ha convinto i tedeschi a sospendere, inducendo USA e Russia ad un clamoroso ritiro della "scoperta impossibile". In effetti è un Sistema Periodico diverso da quello che abbiamo studiato a Chimica: gli elementi sono disposti secondo una sequenza particolare che si chiama Ordine di Riempimento dei Livelli Atomici. In questo modo vengono a trovarsi "prodigiosamente" in perfetto ordine. Uno dei "difetti" della tavola di Mendeleev era che pur essendo nata acciocché gli elementi posti in linea orizzontale e verticale fossero affini, in pratica finiva per avere commischiati Gruppi A e

Gruppi B tra loro.

Inoltre non c'era modo di inserire in sequenza gli elementi chiamati Lantanidi e Attinidi, che per questo rimanevano "fuori tavola". Nella nuova tavola di cui ha il copyright l'ex-medico, finalmente si ha un colpo d'occhio gradevolissimo: gli elementi di Gruppo A compaiono a sinistra, gli elementi di Gruppo B a destra, con i Gas nobili al centro. Superfluo dire che tutti gli elementi affiancati o sovrapposti in questo modo sono affini e che i Lantanidi e gli Attinidi si incastrano in sequenza perfettamente e quindi entrano nella tavola e non rimangono fuori. La Nuova Tavola Periodica quindi mostra 50 elementi di Gruppo A e 62 elementi di Gruppo B, per un totale di 112.

Tuttavia ha 116 caselle! Proprio questo "particolare" è rappresentativo della seconda importante scoperta concernente l'aver trovato "cosa" crea gli elementi stessi. La presenza di 4 caselle nere non è solo un "riempitivo" grafico!

Il significato concettuale è stato così rilevante, da indurre immediatamente il C.E.R.N. di Ginevra all'annullamento della ricerca della particella che crea la materia! (Il "LEP" è stato spento il 2 novembre 2000, pochi giorni dopo la convocazione di Corbucci in Germania).

Cercheremo di spiegarlo con una esemplificazione: quelle quattro caselle nere rappresentano il "dove" esce fuori la massa che hanno gli elettroni di un atomo, al pari di come le cose di un mago escono dal "fondo" del suo cappello. Il passo successivo per Corbucci è stato trovare anche il "luogo" dove le particelle che compongono il nucleo di un atomo, "tirano fuori" la massa, migliaia di volte maggiore di quella degli elettroni. Ebbene, anche nel nucleo ha trovato che c'è un'area nera, localizzando perfettamente la posizione di questo secondo "fondo di cappello del mago" e risalendo nientedimeno agli intimi meccanismi con cui tutte le particelle assorbo-

no la giusta massa che compete loro e perfino che cosa contiene quell'area nera, che ha battezzato vuoto quantomeccanico. Quell'area nera conterrebbe i mattoni fondamentali della fisica (Rishoni) che si chiamano in ebraico con le iniziali delle lettere V e T (imparando a destreggiarsi con questi meccanismi si potrebbe arrivare a creare atomi con la massa desiderata: un blocco d'acciaio del peso di tonnellate può essere ridotto a galleggiare in aria o al contrario un pallino di piombo può essere portato a pesare quanto un transatlantico). È interessante apprendere che sarebbe scientifico e corretto dare il nome di "V" al numero del Sistema Periodico (112°), traendolo dal nome dei due ultimi mattoni V e T, che per una incredibile coincidenza è l'abbreviazione della città di Viterbo, da cui il nome Viterbio, sigla chimica Vt, numero atomico 112: per l'ultimo atomo scoperto nel 1996 da un fisico di Viterbo. Ma è incredibile anche che sia stato scoperto da un umile fisico di Viterbo, medico dentista, che ora ha lasciato il suo trapano per aver fatto quella che ha tutte le carte in regola per essere una delle più grosse scoperte scientifiche della storia della fisica.

in presenza dell'anticoagulante (Bizzaro & Brandalise, 1995; Casonato et al., 1994; Muniz-Diaz et al., 1995).

Caso clinico

È giunta alla nostra osservazione presso il Reparto di Chirurgia Orale del Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali la paziente C.G. di anni 46 che lamentava una sintomatologia algica diffusa in corrispondenza della regione emimascellare superiore sinistra e della regione emimandibolare destra. All'esame radiografico ed all'esame obiettivo si è fatta diagnosi di carie complicata a carico del secondo molare superiore sinistro, parodontite cronica a carico del secondo molare inferiore destro e la disodontiasi dei due terzi molari mandibolari e del terzo molare superiore destro.

All'esame anamnestico la paziente ha riferito di aver subito da circa vent'anni un intervento chirurgico di sostituzione della valvola mitralica con protesi valvolare meccanica e, pertanto, risultava in terapia con anticoagulanti orali (Coumadin, 1 cp/die). Dagli esami ematochimici preoperatori si sono rilevati un'attività protrombinica pari al 33%, un INR di 2,39 ed una tempo di tromboplastina parziale attivata di 42 secondi. L'esame emocromocitometrico ha mostrato, inoltre, una severa piastrinopenia con una conta piastrinica pari a $7 \times 10^3/\mu\text{L}$ di cui la paziente non risultava a conoscenza né si osservava una sintomatologia clinica correlata a tale riscontro ematochimico quali petecchie, epistassi, emorragie spontanee, ematomi dopo traumi minimi. Per tale ragione la paziente è stata sottoposta ad una serie d'indagini suppletive in grado di approfondire la questione. Innanzitutto

dal punto di vista funzionale non si sono riscontrate alterazioni dell'emostasi primaria, infatti il tempo di emorragia secondo Ivy era uguale a 2'.

Sono state escluse anche le forme di piastrinopenia da distruzione, da sequestro, da farmaci, da patologia epatica, nessuna delle quali era supportata da evidenti riscontri clinico-anamnestici o ematologici. A questo punto si è proceduto alla ricerca di anticorpi antiplastrine per diagnosticare un'eventuale forma di piastrinopenia autoimmune, ma i tests diretto e indiretto per la ricerca dei suddetti anticorpi risultavano negativi. Il nostro orientamento diagnostico, quindi, si è spostato verso una forma di pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente. Si è proceduto, pertanto, al controllo della conta piastrinica utilizzando tre diversi anticoagulanti: citrato fosfato destrosio (CPD), etilendiamminotetraacetato (EDTA) e citrato di sodio. La conta, inoltre, è stata controllata in un campione (8 ml) subito dopo il prelievo venoso (conta basale) e a distanza di due ore dallo stesso (Tab. I).

Dopo l'esame di tali rilievi ematochimici si è giunti alla diagnosi certa

di una pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente.

L'unica controindicazione, pertanto, all'intervento chirurgico era rappresentata dai valori alterati di PT, APTT e INR compatibili con la terapia anticoagulante orale. In accordo con il cardiocirurgo abbiamo optato per un protocollo chirurgico alternativo senza la tradizionale sospensione della terapia anticoagulante orale e la sua sostituzione con calciparina. Secondo un'esperienza ormai consolidata presso il nostro Reparto di Chirurgia Orale abbiamo scelto di utilizzare come presidio emostatico locale il concentrato di piastrine e il plasma autologhi da applicare dopo l'attivazione direttamente negli alveoli successivamente alle estrazioni dentarie.

In collaborazione con l'Area Funzionale di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" è stato messo a punto un protocollo che prevede la preparazione del concentrato piastrinico a partire da sangue intero mediante due diverse fasi di centrifugazione secondo velocità e tempi differenti (Marx et al., 1998).

Prima di procedere alla preparazio-

Tab.1

CONTROLLO DELLA CONTA PIASTRINICA		
ANTICOAGULANTE	CONTA BASALE	CONTA DOPO 2 ORE
CPD	$191 \times 10^3/\mu\text{L}$	$195 \times 10^3/\mu\text{L}$
EDTA	$108 \times 10^3/\mu\text{L}$	$21 \times 10^3/\mu\text{L}$
CITRATO DI SODIO	$180 \times 10^3/\mu\text{L}$	$157 \times 10^3/\mu\text{L}$

Tab.2

CONTROLLO DELLA CONTA PIASTRINICA DOPO 24 ORE NEL CONCENTRATO OTTENUTO	
ANTICOAGULANTE	CONTA PIASTRINICA (Concentrato)
CPD	$258 \times 10^3/\mu\text{L}$
EDTA	$18 \times 10^3/\mu\text{L}$
CITRATO DI SODIO	$140 \times 10^3/\mu\text{L}$



ne del concentrato abbiamo controllato i valori della conta piastrinica della paziente a distanza di ventiquattro ore e nei tre anticoagulanti differenti sopraccitati in una piccola quota di concentrato piastrinico ottenuto dalla lavorazione di un esiguo campione venoso (10 ml) secondo la metodica standardizzata della doppia centrifugazione descritta successivamente (Tab. II).

Solo a questo punto la paziente è stata sottoposta ad un'autotrasfusione di circa 250 ml di sangue venoso che sono stati conservati in una sacca contenente il citrato fosfato destrosio adenina 1, utilizzato come sostanza anti-coagulante. È stata utilizzata una sacca quadrupla rappresentata da quattro diverse sacche termosigillate e collegate tra loro al fine di ottenere un sistema di lavorazione assolutamente chiuso rispetto all'ambiente esterno e quindi sterile poiché non soggetto a contami-

nazioni di nessun genere. Dopo circa 2 ore dall'autotrasfusione si è proceduto all'esecuzione di una prima centrifugazione a 1500 RPM per 16 minuti da cui si ricavano, in uno strato più superficiale, circa 150 ml di plasma ricco di piastrine contenente il 70-90% di piastrine e il 10% di leucociti e, in uno strato più profondo, circa 100 ml di globuli rossi. A questo punto si è passati alla separazione del plasma ricco di piastrine lasciando nella sacca di raccolta il concentrato eritrocitario che viene conservato fino alla scadenza (40 giorni). Il plasma ricco di piastrine subisce una seconda centrifugazione più rapida a 2800 RPM per 12 minuti. In tal modo si ricavano due diverse fasi che saranno successivamente separate tra loro: nello strato superiore si ottengono circa 120 ml di plasma povero di piastrine da cui si ricava tramite il suo congelamento a -40°C e il lento scongelamento a 4°C per una

notte intera (8 ore) il crioprecipitato contenente la maggior parte dei fattori della coagulazione (Fatt. VII, Fatt. VIII, fibrinogeno, fibronectina ecc.); nello strato inferiore si ottengono, invece, circa 30 ml di concentrato piastrinico (PRP).

Il concentrato piastrinico è stato conservato tra i 22° e i 25° in agitazione lenta e continua ed è stato utilizzato il giorno dopo l'autotrasfusione.

Il concentrato piastrinico è stato prelevato mediante una siringa con ago sterile e miscelato in un dappen sterile insieme al crioprecipitato prelevato allo stesso modo. Si è proceduto poi all'attivazione della miscela mediante l'aggiunta di botropase ovvero batroxobina, equivalente all'attività coagulante di $1 \pm 0,2$ unità trombiniche internazionali, e di calcio gluconato 446 mEq che si oppone all'attività della sostanza anticoagulante contenuta nelle sacche durante la centrifugazione. La miscela è stata agitata per circa 30 secondi al fine di avviare il processo di gelificazione che si è completato nell'arco di 5 minuti circa.

Previa terapia antibiotica parenterale (gentamicina, 160 mg die; clindamicina, 400mg/die) la paziente è stata sottoposta a cinque estrazioni alveolari (18, 27, 38, 47, 48) in anestesia locale con particolare attenzione a preservare l'integrità delle corticali e dei setti ossei e praticando un'adeguata sutura capace di stabilizzare maggiormente il gel piastrinico ottenuto all'interno degli alveoli sebbene la capacità di adesività del gel alle pareti alveolari sia risultata soddisfacente (Figg. 1, 2, 3, 4).

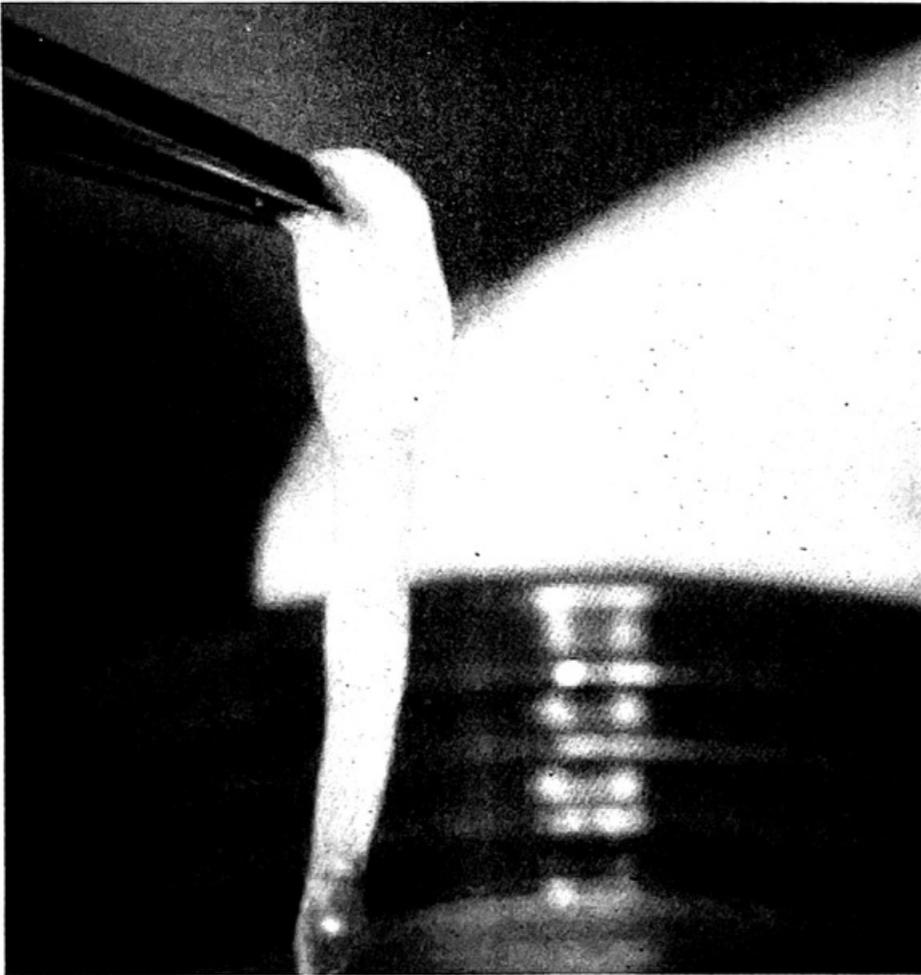
Non si è avuta alcuna complicanza

Tab 1: Controllo della conta piastrinica.

Tab. II: Controllo della conta piastrinica dopo 24 ore nel concentrato ottenuto.

Figura 1: Alveoli post-estrattivi di 17 e 18.

2



3



emorragica sia nell'immediato post-operatorio che nei cinque giorni successivi all'intervento chirurgico dopo i quali la paziente è stata dimessa.

◆ Discussione e conclusioni

La pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente non comporta una riduzione della funzionalità piastrinica tanto da aver consentito per la paziente in esame l'utilizzo del protocollo mediante attivazione del concentrato piastrinico.

Risulta evidente, pertanto, quanto sia importante nella gestione del paziente affetto da pseudotrombocitopenia EDTA-dipendente la diagnosi differenziale con altre forme di piastrinopenia evitando, così, grossolani errori clinico-terapeutici.

La metodica del concentrato piastrinico viene applicata da circa tre anni presso il Reparto di Chirurgia Orale del II Policlinico di Napoli per il trattamento dei pazienti cardiocirurgici e presenta vantaggi sicuramente superiori agli aspetti sfavorevoli (**Tab. III**).

Le caratteristiche vantaggiose del PRP-gel sono rappresentate da: facile estrazione, buona versatilità, estrema maneggevolezza, facile applicazione e basso costo. La sua natura autologa impedisce la trasmissione di malattie infettive, il suo impiego clinico nei pazienti soggetti a terapia anticoagulante azzerà il rischio tromboembolico, legato alla modificazione della terapia e ne rende più breve la degenza.

Di contro esistono alcune limitazioni all'impiego clinico dei PRP-gel legate alla breve sopravvivenza delle piastrine (5 giorni), alla selezione del paziente che deve poter sostenere un prelievo venoso e deve avere un'adeguata conta piastrinica basale. A tutt'oggi, inoltre, è bene evidenziare che una rigorosa disposizione legisla-



Tab.3

CARATTERISTICHE DELLA METODICA TERAPEUTICA CON PRP-GEL

VANTAGGI	SVANTAGGI
Buon adattamento al sito operatorio	Selezione accurata del paziente
Facili attivazione ed applicazione	Breve sopravvivenza delle piastrine (5 giorni)
Natura autologa	Estrazione e manipolazione del gel da parte di personale specializzato
Nessuna sospensione della terapia anticoagulante	
Basso costo	

tiva in materia di emoderivati ne vieta un suo impiego se non in strutture pubbliche riservando la possibilità di trasporto e manipolazione degli emoderivati al solo personale specializzato.

Figura 2: Gel piastrinico ottenuto.

Figura 3: Posizionamento negli alveoli del gel piastrinico.

Figura 4: Sutura in seta.

Tab. III: Caratteristiche della metodica terapeutica con PRP-gel.

BIBLIOGRAFIA

- ◆ **Bizzaro N., Brandalise M. (1995)**
EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. Association with antiplatelet and antiphospholipid antibodies.
Am J Clin Pathol; 103(1): 103-7.
- ◆ **Blonska M., Krol W. (2001)**
Pseudothrombocytopenia.
Wiad Lek; 54(5-6): 333-6.
- ◆ **Bagnani G., Bianconcini G., Brogna R., Zoli G. (2001)**
Pseudothrombocytopenia: clinical comment on 37 cases.
Minerva Med; 92(1): 13-7.
- ◆ **Casonato A., Bertomoro A., Pontara E., Dannhauser D., Lazzaro A.R., Girolami A. (1994)**
EDTA-dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIb-IIIa.
J Clin Pathol; 47(7): 625-30.
- ◆ **De Caterina M., Fratellanza G., Grimaldi E., Varriale V., Scopacasa F., Di Maro G., Formisano S. (1993)**
Evidence of a cold immunoglobulin M autoantibody against 78-kD platelet glycoprotein in a case of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia.
Am J Clin Pathol; 99(2): 163-7.
- ◆ **Fiorin F., Steffan A., Pradella P., Bizzaro N., Potenza R., De Angelis V. (1998)**
IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein Iib.
Am J Clin Pathol; 110(2): 178-83.
- ◆ **Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmele S.R., Strauss J.E., Georgeff K.R. (1998)**
Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 85: 638-646.
- ◆ **Muniz-Diaz E., Madoz P., Pujol-Moix N., Pastoret C., Arilla M., Ibanez M., Guanybens C., Domingo-Albos A. (1995)**
Characterisation of antibodies directed against platelet cryptantigens detected during the immunological study of 356 consecutive patients with presumed autoimmune thrombocytopenia (AITP).
Transf Med; 5(3): 185-91.