

Vliv preanalytiky na koagulační vyšetření

Michal Klus
Olomouc 2019

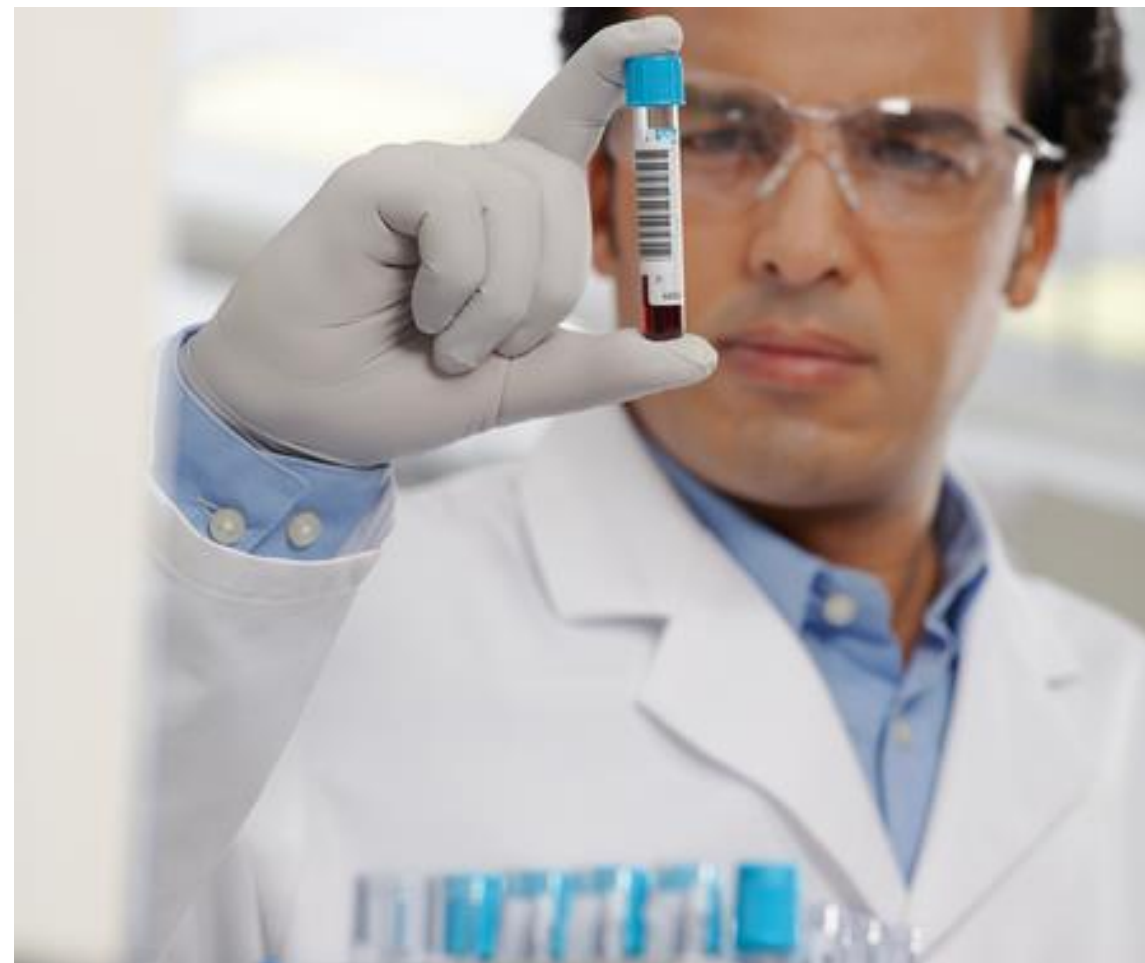


White Paper

Pre-analytical Variables In Routine Coagulation Testing: Setting the Stage for Accurate Results

Úvod

Moderní analyzátory se stále zlepšují v citlivosti a reprodukovatelnosti analytické fáze. Naproti tomu, mnoho preanalytických aspektů se různí a může mít vliv na výsledky koagulačních vyšetření. PT a APTT tvoří největší skupinu vyšetření v koagulační laboratoři. Tyto metody se využívají pro hodnocení široké škály klinických stavů od diagnostiky po monitorovací účely. Odvozují se z nich mnohé speciální testy, jako vyšetřování faktorů nebo aktivit proteinů C a S.



PAVs

Pre-analytical variables

Pre-analytické variability

Pre-analytické variability lze rozdělit do 3 kategorií. Každá z těchto kategorií zahrnuje množství individuálních možností, které mohou mít vliv na testování. Některé variability se různě projevují v kombinaci s reagensy a přístrojem.

- Odběr vzorků (včetně výběru pacienta)
- Transport a stabilita vzorku
- Zpracování a skladování vzorků

Výběr pacientů

Odběr vzorku

Doporučení pro výběr pacientů

- Každá laboratoř by měla mít stanoveny vlastní referenční intervaly v závislosti na populaci.
- Před odběrem by pacienti měli být uvolnění a měli by se vyhnout fyzickému i psychickému stresu, který může ovlivňovat výsledky, obzvláště vWF a funkce destiček.
- Funkce krevních destiček pro studie by měla být prováděna u pustujících pacientů bez léčby.
- U monitorovaných pacientů (např. antikoagulační terapie) je nutné dodržování správného časování. (tabulka)

Drug Class	Drug	Monitoring/Measuring Test	Optimal or Desired Time of Blood Collection	Notes
Heparin	Unfractionated	APTT Anti-Xa	6 hours after dose initiation or adjustment	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-Xa measurements also acceptable. • Circuit anticoagulation may require more frequent monitoring. • Circuit anticoagulation may require higher dosing that cannot be measured by APTT, so ACT may be the optimal test. • Hybrid or LMWH calibrated anti-Xa are acceptable. • Pentasaccharide-calibrated anti-Xa reported in mg/L or mg/dL.
	Low-molecular-weight	Anti-Xa	4 hours after third dose	
	Pentasaccharide	Anti-Xa	3 hours after dose	
Vitamin K Antagonists	Antagonist—oral	PT/INR (baseline PT/INR should be collected prior to initiation of therapy)	First INR is with 12–24 hours of first dose	<ul style="list-style-type: none"> • If outside target, consider VKORC mutation. • If within target, dose is probably acceptable. • If lower than target, probably need to adjust dose higher. • Patient may have additional reversal agents. • More-frequent monitoring may be necessary if patient is bleeding.
	(reversal therapy)	PT/INR	IV: 12 hours Oral: 12–24 hours	
Antithrombotics	Antiplatelet—oral	Platelet-function tests	1 week after initiation of therapy	<ul style="list-style-type: none"> • No consensus on method for measuring or whether necessary. • Methods include PFA System, ULTEGRA, and traditional platelet aggregation. • POC or platelet-function methods, including ULTEGRA, TEG, or ROTEM-based methods. Traditional platelet aggregation studies may also be suitable. • No consensus or recommendations for monitoring available. • Platelet-function tests (if concomitant therapy, then ACT) • 30 minutes for checking catheter function. • No consensus or recommendations for monitoring available.
	Antiplatelet— intravenous	Platelet-function tests (if concomitant therapy, then ACT)	Drug-dependent Within 0.5–2 hours	
	Fibrinolytics	TT, FBG, XDP, FDP	10–15 minutes after completion of infusion	
	Anti(fibrin)olytics	PT/INR, APTT, ACT	Max. concentration at 2 hours after initiation of infusion	
	DTI	APTT, anti-II, ECA, ECT (may require ACT if high dose for PCI), dilute thrombin time	HIT treatment: 4–6 hours PCI infusion: 5 and 45 minutes	<ul style="list-style-type: none"> • Drug labeling indicates APTT or ACT, but other more-specific testing may be desirable, especially when therapeutic target is not achieved.
DOAC	IIa	ECT, ECA, IIa, dTT	Trough samples (5–30 minutes prior to next dose)	<ul style="list-style-type: none"> • Collect just before next dose. • If peak samples are desired, then usually 2–3 hours after dose. • Collect just before next dose. • If peak samples are desired, then usually 2–3 hours after dose. • Specific drug-calibrated anti-Xa. • No consensus or recommendations for monitoring. • No consensus or recommendations for monitoring. • The drug is continuously infused. Once infusion has stopped, DOAC levels may rise. • Specific DOAC-calibrated anti-Xa. • Note that newer replacement therapies for hemophilia using modified (PEGylated, albumin-fused, etc) factor replacement may require special methods. • Single-stage clotting assay or chromogenic assay may be preferred. • Drug delivery is either by nasal spray or infusion. • No consensus or recommendations for monitoring. • For APCC, no relationship to decreasing clotting times and bleeding outcomes. • No consensus or recommendations for monitoring. • FBG, FVIII, FXIII, or other factors may be assessed if replacing for that purpose.
	Xa	Drug-calibrated anti-Xa	Trough samples (5–30 minutes prior to next dose)	
	Reversal—dabigatran	ECT, ECA, anti-IIa	10–15 minutes after completion of infusion	
	Reversal—rivaroxaban/apixaban	Anti-Xa	4 hours after infusion to reassess anti-Xa	
Factor Replacement	Replacement therapy (hemophilia A or B)	Factor level	Physician-guided. PK studies may be required. Consider baseline, 30 min, 60 min, 2, 4, 8, 12, and 24 hours for PK time periods.	<ul style="list-style-type: none"> • Note that newer replacement therapies for hemophilia using modified (PEGylated, albumin-fused, etc) factor replacement may require special methods. • Single-stage clotting assay or chromogenic assay may be preferred. • Drug delivery is either by nasal spray or infusion. • No consensus or recommendations for monitoring. • For APCC, no relationship to decreasing clotting times and bleeding outcomes. • No consensus or recommendations for monitoring. • FBG, FVIII, FXIII, or other factors may be assessed if replacing for that purpose.
	DDAVP/vasopressin	VWF, FVIII	Baseline, 30 minutes, 2, 4, and 6 hours post-drug delivery	
	PCC or APCC	PT/INR, APTT	Baseline (pretreatment) and 15–30 minutes after completion of administration	
	rVlla	PT/INR	10–15 minutes after infusion	
	FFP, cryoprecipitate, or other plasma-based products	PT/INR, APTT	Baseline (preinfusion) and 30 minutes	

Výběr pacientů

Odběr vzorku

Doporučení pro odběr vzorků

- Byly pozorovány významné rozdíly u PT a APTT při použití zkumavek o stejné koncentraci citrátu od různých výrobců. Laboratoř by měla validovat tyto systémy před použitím.
- U náběru stříkačkou by měla být použita stříkačka menší než 25 ml (ideálně 10 ml) v kombinaci s jehlou s „motýlkovým“ systémem.
- Jehly pro koagulační náběry by měly mít velikost od 22 do 19 G, menší jehly (23-25G) jsou doporučeny pro pediatrické vzorky a špatný žilní přístup.
- Pro náběry větší než 30 ml jsou doporučovány jehly velikosti 18 G.
- Doba zaškrcení by neměla přesáhnout 1 minutu.
- Po náběru stříkačkou by měla být krev opatrně přesunuta do vhodné zkumavky do 1 minuty od náběru.
- Pro náběry z arterií by měla být použita technika dvou stříkaček. První náběr 10 ml pro „vyčištění cesty“ a druhá pro náběr.
- Pro intravenózní náběry zastavte kanylu na 5 minut. Poté použijte techniku 2 stříkaček (bod výše).

Výběr pacientů

Odběr vzorku

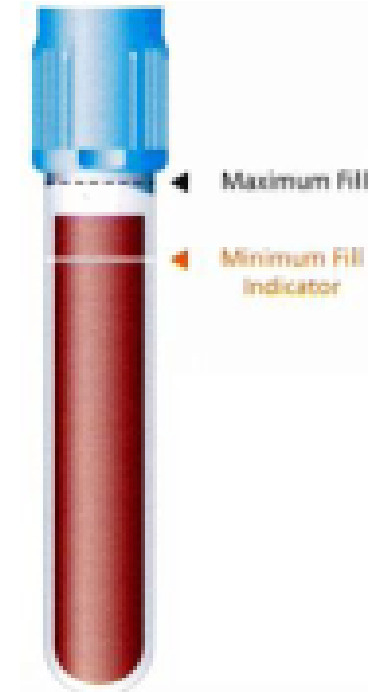
Doporučení pro odběr vzorků

- Řiďte se pokyny výrobce pro nedostatečný nebo nadměrný náběr vzorku. Obojímu by jste se měli vyhnout, dokud si laboratoř nestanoví vlastní akceptační kritéria.
- Nedostatečný náběr dominuje falešně zvýšeným hodnotám PT a APTT.
- Doporučuje se šetrné promíchání (převrácením) citrátové zkumavky asi 5 – 6x. Vyvarujte se třepání.
- Doporučená koncentrace citrátu je 3,2%.
- U pacientů s náběrem více zkumavek pro různá testování je důležitý správný postup (tabulka).
- http://hematology.cz/doporuzeni/laboratorni_sekce/files/obecna/Doporuzeni_LS_CHS_CLS_JEP-Poradi_odberu_v01.pdf
- Pokud jsou nabírány pouze citrátové zkumavky, není nutné likvidovat žádné zkumavky (pokud se nejedná o „motýlkovou kanylu“).
- Pacienti se zvýšeným hematokritem (>55%) vyžadují zkumavky se sníženým objemem citrátu.

Výběr pacientů

Odběr vzorku

Order of Draw	Vacuum Tube Type	Color of Cap	Test Type
1	Blood culture tubes	Color varies	Blood culture
2	Sodium citrate (3.2%)	Light blue	Coagulation
3	Glass (no activator)	Red	Chemistry, immunoassays
4	SST	Gold or red/black	Chemistry, serology
5	Trace elements (no preservative)	Royal blue	Trace element toxicology
6	Sodium or lithium heparin	Green	Chemistry
7	EDTA	Lavender or pink	Hematology, blood bank
8	Sodium fluoride	Gray	Glucose
9	ACD	Yellow	Blood bank HLA testing
10	QUANTIFERON-TB	Gold	TB testing



Transport vzorku

Stabilita vzorku

Doporučení pro transport a stabilitu vzorku

- Koagulační vzorky by neměly být ukládány na ledu.
- Vzorky pro agregační vyšetření musí být udržovány v pokojové teplotě.
- Vzorky plné krve pro vyšetření PT jsou stabilní 24 hodin při pokojové teplotě.
- Vzorky plné krve pro vyšetření APTT jsou stabilní 4 hodiny při pokojové teplotě (pro monitoraci UFH 1 hodinu).
- Pro ostatní testy, pokud výrobce neuvádí jinak, je stabilita plné krve 4 hodiny.
- Pneumatické transportní systémy (potrubní pošta) by se neměly používat u vzorků s požadavkem vyšetření funkcí destiček.
- Vzorky získané mimo nemocnici by měly být přepravovány v kontejnerech zajišťujících stálou pokojovou teplotu a minimalizovat míchání.
- Převážené vzorky by měly být stabilizované vzpřímeně.

Zpracování vzorku

Skladování vzorku

Doporučení pro zpracování vzorku

- Pro koagulace se používá bezdestičková plasma (PPP), výjimkou jsou testy z plné krve a funkce destiček.
- PPP je definována jako <math><10\ 000</math> destiček/ μL .
- Centrifugace na PPP by měla probíhat při pokojové teplotě (15-25°C).
- Přestože je doporučena centrifugace k získání PPP 1500g po 10 min (15), měla by každá laboratoř ověřit vlastní nastavení centrifugace pro získání správné PPP. (**ČR 2500g 15 min**)
- Všechny koagulační vzorky by měly být centrifugovány 2x před zamražením.
- Počet destiček v PPP by měl být ověřován alespoň 1x ročně.
- Víceru zkumavek od jednoho pacienta by nemělo být smícháno před zamražením.

Zpracování vzorku

Skladování vzorku

Doporučení pro skladování a rozmražování

- Vzorky, které nelze zpracovat v limitu stability by měly být zamrazeny v 0,5-1 ml alikvotech, v polypropylenových označených lahvičkách.
- Optimální zamražení je $< -70^{\circ}\text{C}$ v mrazácích bez námrazy – stabilita 6 měsíců.
- Mražení PPP v -20°C zajišťuje stabilitu 2 týdny.
- Zavíčkované vzorky by měly být rozmražovány v 37°C vodní lázni.
- Rozmražená PPP musí být důkladně promíchána před analýzou.

Doporučení pro případy hemolýzy, ikterity a lipemie

- HIL zákal může ovlivnit schopnost správného odečtení vzorku u optických systémů.
- Podezřelé hemolytické vzorky by měly být odmítnuty.
- Lipemické vzorky mohou být zpracovány po utracentrifugaci, ale běžné vzorky by měly ověřit správnost výsledků z ultracentrifugy.
- Ikterické vzorky mohou interferovat u chromogenních metod.
- Infuze produktů HBOC mohou v plazmě tvořit pseudo-hemolýzu, což může interferovat u koagulačních a chromogenních metod.

Hemolysis¹

Assay	Effect
PT sec, PT INR	↑
PT %	↓
APTT sec	↑ ↓
Fbg g/l	↓
D-Dimer mg/l	↑
AT %	↓
TT sec	↑
VWF %	↑

Heparin contamination³

Assay	Effect
PT sec, PT INR	↑
PT %	↓
APTT sec	↑
Fbg g/l	↓
Factors %	↓
TT sec	↑
PC PS %	↓
AT %	↓
LA	false

Coagulation activation² (partial clotting)

Assay	Effect
PT sec, PT INR	↑
PT %	↓
APTT sec	↑ ↓
TT sec	↑
FII, FV, FVIII %	↓
FVII %	↑
D-Dimer mg/l	↑
VWF %	↓

Sample dilution (excess CaCl₂-Citrate binding)⁴

Assay	Effect
PT sec, PT INR	↑
PT %	↓
APTT sec	↑
Factors %	↓
TT sec	↑
D-Dimer mg/l	↓

5

Závěr

Preanalytická variabilita může mít významný vliv na výsledky rutinních a speciálních koagulačních testů. To může vést v problematickou interpretaci výsledků a s tím spojená rizika pro pacienta. Laboratoře by se měly řídit doporučenými pokyny, zahrnujícími návody k reagensiím a přístrojům pro vhodný výběr a zacházení se vzorky.

Dodržování vhodných a jednotných postupů v pre-analytice povede k přesnějším a reprodukovatelnějším výsledkům.



Pre-analytical Variables In Routine Coagulation Testing: Setting the Stage for Accurate Results

Robert C. Gosselin^a and Richard A. Marlar^b

^aHemophilia Treatment Center, University of California, Davis Health System, Sacramento, CA, U.S.

^bDepartment of Pathology, University of New Mexico Health Sciences Center Albuquerque, NM, U.S.

Introduction

Many pre-analytical variables (PAVs) may affect the results of routine coagulation assays. To improve the precision and accuracy of laboratory testing, it is critical to identify these variables and realize their potential impact.^{1,2} Additionally, advances in laboratory instrumentation have improved the reproducibility and sensitivity of the analytical phase, therefore creating greater dependence on specimen integrity.^{3,5} The activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) determinations are among the most frequently ordered screening tests in the clinical laboratory. These assays are used in the evaluation of a wide variety of clinical conditions, for either diagnostic or monitoring purposes. These screening tests also form the basis of many special coagulation tests, such as factor assays and proteins C and S activity assays.

Since the introduction of coagulation assays, efforts have been made not only to automate these assays, but to better standardize testing, thus providing more-accurate results to aid in clinical assessment.⁴⁻⁶ PAVs pertaining to routine coagulation testing can be classified into three major categories:

1. Specimen collection (including patient selection)
2. Specimen transportation and stability
3. Specimen processing and storage

Within each of these categories, there are a number of individual variables, each of which may have a major impact on testing. There are also a number of variables related to the analysis of the specimen, many of which are dependent on the reagent(s) and instrumentation, but variables associated with analysis are beyond the scope of this document.

Many standards for testing in the general clinical laboratory and specifically in the coagulation laboratory have been developed in an effort to improve precision and accuracy.⁷⁻¹⁰ The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) is the primary organization for clinical laboratory standards and guidance documents in the

United States, although their guidelines are also referenced and used internationally.⁴ The CLSI was established in 1968 as a group of individuals representing industry, government, and professionals dedicated to the development of standards and guidance documents for clinical laboratory testing. Despite CLSI's existence, there is still a lack of practice standardization among clinical laboratories regarding specimen collection, storage, and processing for coagulation testing. Some of the procedures in practice today are apparently founded on tradition, while others are based on CLSI guidelines, with and without significant published or supporting evidence. As a result, a number of problems, inconsistencies, and erroneous results can still arise based on pre-analytical processing of the specimen, and these discrepancies may be associated with disastrous outcomes. This manuscript will review the pre-analytical variables and some analytical variables of laboratory-based coagulation testing. Point-of-care (POC) devices, which may use native or anticoagulated whole blood, are also affected by PAVs but will have limited focus in this document. Recommendations for the proper methods based on published and new data will be presented, together with recommendations for converting to these methods.

Pre-analytical Variables In Routine Coagulation Testing: Setting the Stage for Accurate Results

Gosselin RC, University of California, Davis Health System, Sacramento, California, U.S.

Marlar RA, University of New Mexico Health Sciences Center Albuquerque, New Mexico, U.S.