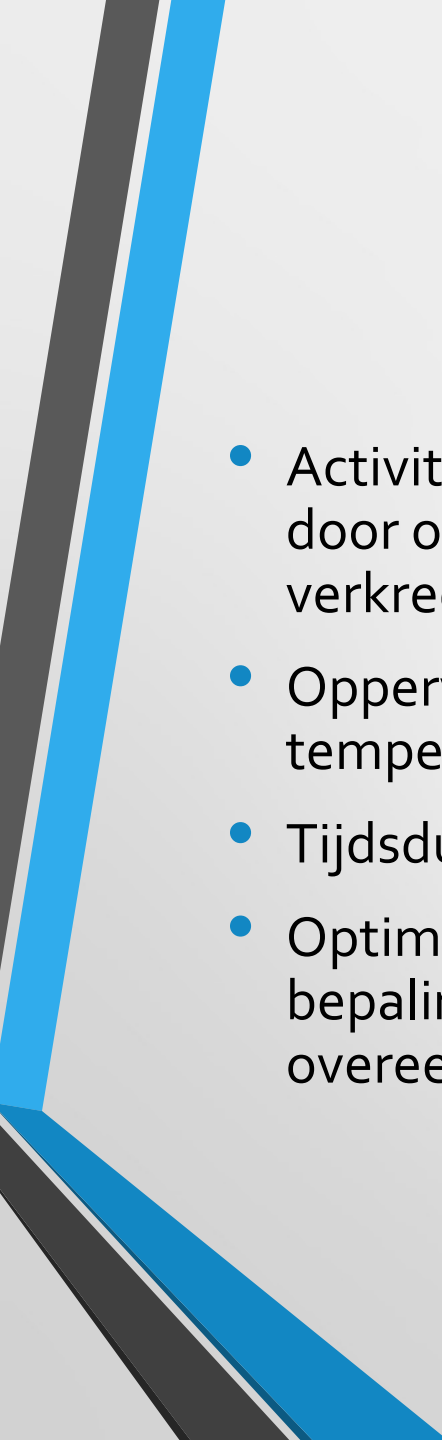




Belangrijke aspecten van de pre-analyse bij stollingsbepalingen: een update

Rene Niessen, klinisch chemicus Medlon

- 
- Activiteit bloedstollingsfactoren in-vitro worden beïnvloed door omstandigheden waaronder bloed en plasma zijn verkregen en bewaard
 - Oppervlakte waarmee bloed en plasma in contact komt, pH, temperatuur en aanwezigheid bloedplaatjes
 - Tijdsduur tussen venapunctie en stollingsbepaling
 - Optimale pre-analytische omstandigheden zijn niet voor alle bepalingen identiek; in literatuur geen volledige overeenstemming over de optimale omstandigheden

Preamalytische voorschriften voor stollingsbepalingen

2012

Sectie Stolling van de SKML
Secretariaat:
Postbus 100
2250 AC VOORSCHOTEN

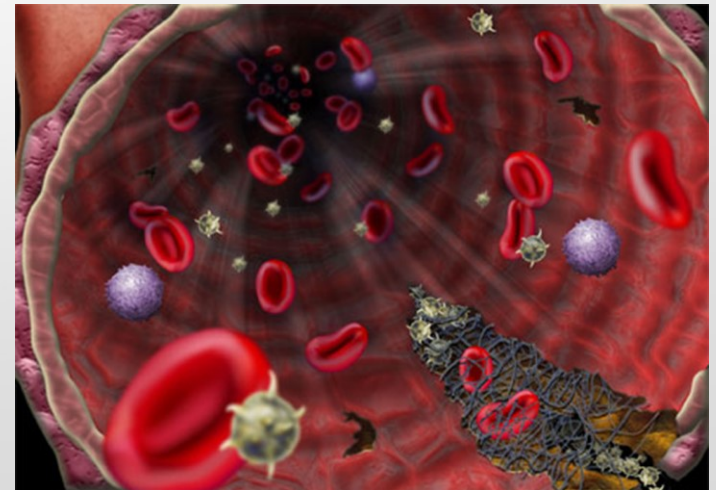
Preamalytische voorschriften voor de stollingsbepalingen: PT, PT-INR, aPTT, fibrinogeen, FV, FVIII, antitrombine, D-dimeer en lupus anticoagulans.

2016

Stichting Kwaliteitsbevordering Stollingsonderzoek
Secretariaat:
Postbus 97
2250 AB VOORSCHOTEN

Opbouw

- Venapunctie
- Afname- en opslagbuizen
- Anticoagulans
- Transport bloedmonsters
- Centrifugeren
- Hemolytische monsters
- Bewaren van bloed en plasma



Venapunctie

- Screenende stoltesten (PT/PT-INR en aPTT) en stollingsfactorbepalingen kunnen uit eerste afnamebuis bepaald worden
- Bloedcontainers dienen vervaardigd te zijn van niet-reactieve materialen, zoals polypropyleen of gesiliconeerd glas
- Na afname onmiddellijk goed mengen (3-6x kantelen)
- Minimale vulling 90% (CLSI H21-A5)



Venapunctie / buisvulling

- Recente studies laten zien dat minimale buisvulling van 80% geen klinisch relevant effect geeft voor PT-INR
- Onvoldoende duidelijk is echter invloed van verschillende reagentia en gebruik van voorverduunningen in assay
- Advies: indien buisvulling < 90% geaccepteerd wordt dient hier lokaal een controle op te hebben plaats gevonden

INTRODUCTION: CLSI recommends a minimal citrate tube fill volume of 90%. A validation protocol with clinical and analytical components was set up to determine the tube fill threshold for international normalized ratio of prothrombin time (PT-INR), activated partial thromboplastin time (aPTT) and fibrinogen.

METHODS: Citrated coagulation samples from 16 healthy donors and eight patients receiving vitamin K antagonists (VKA) were evaluated. Eighty-nine tubes were filled to varying volumes of >50%. Coagulation tests were performed on ACL TOP 500 CTS(®) . Receiver Operating Characteristic (ROC) plot, with Total error (TE) and critical difference (CD) as possible acceptance criteria, was used to determine the fill threshold.

RESULTS: Receiving Operating Characteristic was the most accurate with CD for PT-INR and TE for aPTT resulting in thresholds of 63% for PT and 80% for aPTT. By adapted ROC, based on threshold setting at a point of 100% sensitivity at a maximum specificity, CD was best for PT and TE for aPTT resulting in thresholds of 73% for PT and 90% for aPTT. For fibrinogen, the method was only valid with the TE criterion at a 63% fill volume.

CONCLUSION: In our study, we validated the minimal citrate tube fill volumes of 73%, 90% and 63% for PT-INR, aPTT and fibrinogen, respectively.

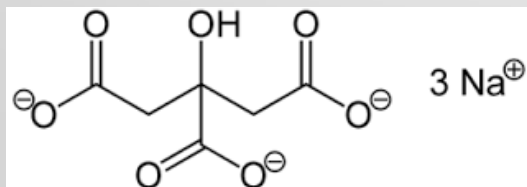
Afname- en opslagbuizen

- Zowel kunststof- als gesiliconeerde glazen buizen zijn geschikt
- Samenstelling buismateriaal en fabricageproces kunnen van invloed zijn op de testresultaten
- Bij overstap van glas naar kunststof en bij verandering van buizenfabrikant is daarom een validatie/controle noodzakelijk (CLSI H21-A5)



Anticoagulans

- Trinatriumcitraat-concentraties van 105 tot 109 mmol/L dienen gebruikt te worden bij stollingsonderzoek
- De SSC raadt hogere concentraties (129 mmol/L; 3,8% trinatriumcitraat) af voor de PT/PT-INR
- Eén volumedeel anticoagulans wordt gemengd met 9 volumedelen bloed (Ht tussen 0,20 – 0,55)



Peterson & Gottfried, Thromb Hemost 1982
Reneke et al, Am J Clin Path 1998

Transport naar het laboratorium

- Bloedmonsters dienen tijdens transport in verticale positie te worden vervoerd
- Geadviseerd wordt om tijdens transport van citraat volbloed dit niet te doen op ijs ($2 - 8^{\circ}\text{C}$); koude activatie, verlies van vWF en verstoring van trombocyten
- Transport middels buizenpost: hoewel geen klinisch relevant verschil gevonden werd voor de aPTT, PT en fibrinogeen bepaling wordt geadviseerd om bij in gebruik name van buizenpostsysteem dit lokaal te valideren

Centrifugeren van bloed

- Doel: verkrijgen van plaatjesarm plasma ($< 10 \times 10^9/L$)
- Geadviseerd wordt om de centrifugatie-condities (snelheid en tijd) lokaal te valideren; veel gebruikt is 1500 g gedurende 15 min
- Bij gebruik van hogere snelheden en kortere tijd kan als vuistregel aangehouden worden aantal g x minuten van ongeveer 20.000 g.minuten



Centrifugeren van bloed (2)

- PT/PT-INR en aPTT zijn ongevoelig voor trombocytentellingen tot $200 \times 10^9/L$; bloedmonsters kunnen hiervoor korter gecentrifugeerd worden (5 of 10 min)
- Bij centrifugeren bij lagere temperaturen bestaat het gevaar van koude activatie van met name factor VII; temperatuurgebied tussen koelkast- en kamertemperatuur lijkt acceptabel (13 – 21 °C)

Centrifugeren van bloed (3)

- Omdat gevoeligheid van bepaling Lupus Anticoagulans beïnvloed wordt door bloedplaatjes en/of bloedcellen dient plasmamonster vrijwel “plaatjesvrij” te zijn
- Dit kan bereikt worden door plasma 2 x te centrifugeren
- Na centrifugeren het plasma over een 0,2 µm celluloseacetaat filter halen wordt afgeraden omdat hierbij selectieve verwijdering optreedt van factor V, VIII, IX, XII en vWF

Hemolytische monsters

- Vrij Hb en andere stoffen kunnen lichttransmissie verstoren van analyses op stollingsanalyzers met foto-optische eindpuntsdetectie
- Door hemolyse vrijgekomen intracellulaire en membraancomponenten kunnen stollingsfactoractivatie veroorzaken die kunnen leiden tot een verkorte PT en aPTT
- Routine stollingsbepalingen worden minder betrouwbaar bij in-vitro hemolyse met een vrij Hb > 0,1 mmol/L; deze monsters dienen dan ook niet in behandeling genomen te worden

Bewaren van bloed en plasma

- Citraat volbloed niet bewaren bij 2 – 8 °C
- Niet-gecentrifugeerde en gecentrifugeerde bloedmonsters voor PT/PT-INR bewaren bij 18 – 24 °C
- Sommige PT reagens/apparaat combinaties kunnen binnen 6 – 24 uur bewaren van niet-gecentrifugeerd bloedmonster bij kamertemperatuur afwijkingen in resultaten laten zien; lokaal dient dit daarom gevalideerd/gecontroleerd te worden

Bewaren van bloed en plasma (2)

- Voor controle UFH of LMWH dient bloedmonster binnen 1 uur na venapunctie te worden gecentrifugeerd; en daarna binnen 4 uur worden geanalyseerd
- Het zo verkregen citraatplasma mag dan binnen die 4 uur zowel bij 2 – 4 °C of 18 – 24 °C bewaard worden

Maximum bewaartermijnen zoals aanbevolen door CLSI H21-A5

Test	Volbloed			Plasma			
	18-24°C	2-4°C	-20°C / -70°C	18-24°C	2-4°C	-20°C*	-70°C*
PT/PT- INR	24 uur	Niet acceptabel	Niet acceptabel	24 uur	Niet acceptabel	2 wk	12 mnd
aPTT	4 uur**	Wordt niet aangeraden	Niet acceptabel	4 uur	4 uur	2 wk#	12 mnd#
Fbg	4 uur	Wordt niet aangeraden	Niet acceptabel	4 uur	4 uur	2 wk	12 mnd
FV en FVIII	4 uur	Wordt niet aangeraden	Niet acceptabel	4 uur	4 uur	2 wk	12 mnd
AT	4 uur	Wordt niet aangeraden	Niet acceptabel	4 uur	4 uur	2 wk	12 mnd
LAC	4 uur	Niet acceptabel	Niet acceptabel	4 uur	4 uur	2 wk	NB
D-dim	6 uur	Niet acceptabel	Niet acceptabel	6 uur	1 week	2 wk	12 mnd

* Goed mengen voor testen

** gehepariniseerd: 1 uur

gehepariniseerd: trombocyten < 10 x 10⁹/L

NB Niet bekend

Bewaren van bloed en plasma (3)

- Naast deze CLSI aanbevelingen zijn er verschillende studies die laten zien dat er mogelijk wat meer rek zit in deze bewaartermijnen en –temperaturen
- Voor de aPTT en fibrinogeen worden bewaartermijnen beschreven tussen de 6 – 24 uur, en voor D-dimeer tussen de 24 – 48 uur
- Verschillen in reagens/apparaat combinaties dragen hieraan mogelijk bij; geadviseerd wordt daarom om dit lokaal te valideren/controleren



**Preanalytische voorschriften voor de stollingsbepalingen:
PT, PT-INR, aPTT, fibrinogeen, FV, FVIII, antitrombine,
D-dimeer en lupus anticoagulans.**

2016



