

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

2016

Stichting Kwaliteitsbevordering Stollingsonderzoek

Inhoudsopgave

1.	Inleiding	3
2.	Venapunctie	3
3.	Afname- en opslagbuizen	4
4.	Anticoagulans	5
5.	Transport naar het laboratorium	5
6.	Centrifugeren van het bloed	5
7.	Hemolytische monsters	6
8.	Bewaren van bloed en plasma	7
	Referenties	10
	Appendix	13

Gebruikte afkortingen

AT	Antitrombine
aPTT	Geactiveerde partiële tromboplastine tijd
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ECAT	European Concerted Action on Thrombosis
EDTA	Ethyleendiaminotetra-azijnzuur
D-dim	D-dimeer
F	Factor
Fbg	Fibrinogeen
Ht	Hematocriet
INR	International Normalized Ratio
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
LAC	Lupus anticoagulans
PT	Protrombinetijd
SSC	Scientific and Standardization Committee

1. Inleiding

De activiteit van de bloedstollingsfactoren in vitro kan worden beïnvloed door de omstandigheden waaronder het bloed en plasma zijn verkregen en bewaard. Hierbij spelen vele factoren een rol, zoals de oppervlakken waarmee het bloed c.q. plasma in aanraking komt, de pH, de temperatuur en de aanwezigheid van bloedplaatjes. Ook speelt de tijdsduur tussen venapunctie en stollingsbepaling een belangrijke rol.

De optimale preanalytische omstandigheden zijn niet voor alle bepalingen identiek. Sommige bepalingen (bijvoorbeeld de aPTT bij heparine-monitoring) zijn gevoeliger voor preanalytische variaties dan andere (bijvoorbeeld de PT/PT-INR). Er bestaat in de literatuur geen volledige overeenstemming over de optimale omstandigheden. ***In het huidige voorschrift is een keuze gemaakt uit de bestaande literatuur voor de stollingsbepalingen: PT, PT-INR, aPTT, fibrinogeen, FV, FVIII, antitrombine, D-dimeer en lupus anticoagulans.***

Veranderingen ten opzichte van de versie 2012 van dit voorschrift zijn cursief en vet weergegeven.

2. Venapunctie

Veneus bloed wordt standaard verkregen door middel van een vacuüm systeem.

Desinfectie van de huid voor venapunctie is bij patiënten zonder verminderde weerstand tegen infectie niet nodig (Werkgroep Infectiepreventie, richtlijn Algemene Huiddesinfectie, 2003). Alle containers moeten zijn vervaardigd van niet-reactieve materialen, zoals polypropyleen of gesiliconeerd glas; 19-21 gauge naalden zijn optimaal. Zowel te kleine als te grote naaldopeningen kunnen hemolyse induceren.

Het bloed moet vlot stromen en moet onmiddellijk goed worden gemengd met anticoagulans d.m.v. voorzichtig kantelen van het buisje (minimaal 3-6 volledige kantelingen in de lengterichting) (CLSI H21-A5, 2008). Gebruik van een stuwband mag niet langer dan 1 minuut plaatsvinden (Lippi *et al*, 2005). De druk moet ongeveer 10 mm Hg (1,33 kPa) onder de diastolische bloeddruk zijn. Zodra het bloed stroomt, moet de stuwband worden losgelaten.

Indien de PT/PT-INR en de aPTT moeten worden uitgevoerd is de eerste afnamebuis bloed adequaat. Uit recent onderzoek is gebleken dat een eerste buis ook adequaat is voor meerdere stollingsfactorbepalingen en remmers van stollingsfactoren (Raijmakers *et al*, 2010). Het is aannemelijk dat dit ook geldt voor de andere in dit onderzoek niet onderzochte stollingsfactoren en proteïne S.

Eerder werd voor de bepaling van stollingsfactoren gesteld dat de eerste buis moest worden weggegooid en de tweede buis moest worden gebruikt. De onderbouwing hiervoor is op zijn best indirect en inmiddels kan gesteld worden dat deze praktijk bij gebruik van een standaard vacuüm systeem niet meer vereist is. Zij kan nog worden overwogen bij een moeizame venapunctie maar in de meeste gevallen zal dan een tweede venapunctie in de andere arm nodig zijn (CLSI H21-A5, 2008).

Het wordt afgeraden om bloedmonsters via katheters af te nemen. Als dit niet kan worden vermeden moeten heparine contaminatie en monsterverdunning worden voorkomen door de lijn te spoelen met 5 ml NaCl 0.9% en de eerste 5 ml bloed of 6 maal het dode volume van het systeem weg te gooien (CLSI H21-A5, 2008).

De aanbevolen volgorde van afname is:

1. bloedkweek
2. citraatbuis
3. serumbuis met of zonder stollingsactivator of gel
4. heparinebuis met of zonder gel
5. EDTA buis
6. buis met glycolyseremmer (*CLSI H3-A6, 2007*)

Het is ook mogelijk bloed af te nemen met behulp van een vleugelnaald. Bij gebruik van een spuit met bloed moet deze onmiddellijk (binnen 1 minuut) in een citraatbuis worden gelegd door de tuit tegen de wand van het buisje te houden, zodat het bloed langs de wand naar beneden stroomt en er geen schuimvorming of overmatige turbulentie optreedt. Buizen met bloed dienen goed afgesloten te worden bewaard.

Een aantal bepalingen, bijvoorbeeld van factor VIII en diverse fibrinolyse parameters, kan worden beïnvloed door stressfactoren. De patiënten hoeven niet nuchter te zijn. Vetrijke maaltijden kunnen optische meetmethoden verstoren. Na afname dient het volume van het bloedmonster te worden gecontroleerd. Onder- of overvulling is een preanalytische fout, die consequenties voor de uitslag kan hebben. ***De CLSI H21-A5 adviseert minimale vulling van 90%. Twee recente studies door Ver Elst et al (2013) en Pretorius et al (2014) tonen aan dat voor PT-INR bepaling een minimale buisvulling van 80% geen klinische relevant effect geeft. Hierbij is het onvoldoende duidelijk wat de invloed is van verschillende reagentia en van gebruik van voorverduunningen in uitvoering van de assay. Daarom wordt geadviseerd, indien een buisvulling gehanteerd wordt <90%, om dit te controleren.***

3. Afname- en opslagbuizen

Kunststof buizen zijn geschikt indien deze geen contactactivatie veroorzaken. Ook gesiliconeerde glazen buizen kunnen worden gebruikt. Vacuümbuizen van zowel kunststof (bijvoorbeeld polypropyleen) als gesiliconeerd glas zijn in de handel verkrijgbaar. De samenstelling van het buismateriaal en het fabricageproces van de buizen kunnen van invloed zijn op de uiteindelijke testresultaten. Zo bleken de resultaten van PT en PT-INR uit bloed afgenomen in een glazen buis hoger of lager te zijn dan uit bloed afgenomen in een kunststof buis (Fiebig *et al*, 2005; van den Besselaar *et al*, 2005). Bij een overstap van glas naar kunststof maar ook bij een verandering van buizen fabrikant is daarom een validatie op basis van een parallel onderzoek, gebruik makend van monsters in de normale range en daarbuiten, noodzakelijk (CLSI H21-A5, 2008).

Het anticoagulans in commerciële bloedafnamebuizen kan in meer of mindere mate verontreinigd zijn met magnesium ionen. Magnesium ionen kunnen de PT-INR in meer of mindere mate verkorten c.q. verlagen. De maximaal toelaatbare concentratie van magnesium ionen in het anticoagulans is 1.0 mmol/l (Van den Besselaar *et al*, 2012)

4. Anticoagulans

Het bij stollingsonderzoek gebruikte anticoagulans is trinatriumcitraat (0,105 tot 0,109 mol/l). Sommige laboratoria gebruiken nog een hogere citraat concentratie (3,8% trinatriumcitraat 2 H₂O; dit is 0,129 mol/l). Deze laboratoria wordt dringend aangeraden de door de SSC (ISTH) aanbevolen concentratie (0,109 mol/l) te gaan gebruiken voor de bepaling van de PT/PT-INR. Vanwege de verwaarloosbare verschillen zijn citraat concentraties van 0,105 en 0,106 mol/l ook acceptabel (Van den Besselaar *et al*, 2000; Adcock *et al*, 1997 en 1998).

Vanuit een praktisch oogpunt is het gewenst de voor de PT/PT-INR aanbevolen citraat concentratie ook voor de andere stollingsbepalingen te gebruiken. Eén volumedeel anticoagulans wordt gemengd met negen volumedelen bloed. Vanuit wetenschappelijk oogpunt zou deze verhouding anders gekozen moeten worden, indien de hematocriet van het bloed lager dan 0,20 of hoger dan 0,55 is (zie appendix). De invloed van de anticoagulans: bloed verhouding op de PT/PT-INR en aPTT is verwaarloosbaar mits deze tussen 1 + 8 en 1 + 12 ligt (Peterson & Gottfried, 1982; Reneke *et al*, 1998; Iversen 1997). Een mengsel van citroenzuur en natriumcitraat (pH 5-6) kan ook worden gebruikt mits de totale citraat + citroenzuur concentratie 0,105 - 0,109 mol/l is.

Indien de tijd tussen venapunctie en meting langer dan 2 uur is wordt een speciale anticoagulans oplossing (CTAD mengsel: 0,109 mol/l citroenzuur, 0,015 mol/l theophylline, 0,0037 mol/l adenosine en 0,198 mmol/l dipyridamol, pH met NaOH op 5,0 gesteld) aanbevolen voor het bewaken van heparine therapie (Contant *et al*, 1983). CTAD remt het vrijkomen van plaatjesfactor 4 dat heparine inactieveert.

5. Transport naar het laboratorium

Tijdens het transport van bloedmonsters naar het laboratorium dienen de daarvoor gebruikte buizen in verticale positie te worden vervoerd (Van Geest-Daalderop *et al*, 2005).

Indien afgenomen citraatbuizen middels een buizenpost naar het laboratorium verzonden worden, wordt geen klinisch relevant verschil gevonden voor de aPTT, PT en fibrinogeen bepaling (Boss et al, 2015). Het wordt wel aangeraden om vóór in gebruik name van buizenpostsystemen dit op te nemen in het validatieproces.

6. Centrifugereren van het bloed

Om plasma te verkrijgen dienen de buizen afgesloten te worden gecentrifugeerd bij een snelheid en gedurende een tijd die benodigd zijn om consistent bloedplaatjesarm plasma te produceren ($< 10 \times 10^9/l$ trombocyten). De centrifugatie snelheid en tijd moeten door het laboratorium zelf worden getest en gevalideerd maar veel gebruikte condities zijn 1.500 x g gedurende minstens 15 minuten (CLSI H21-A5, 2008). Centrifugereren met een hogere snelheid en gedurende een kortere tijd (bijvoorbeeld in microcentrifuges) kan, opnieuw na validatie, eventueel worden toegepast (Hope *et al*, 1991). ***Hierbij kan als vuistregel voor het aantal g x minuten ongeveer 20.000 g minuten aangehouden worden.***

Voor de PT/PT-INR en aPTT in vers plasma kan korter worden gecentrifugeerd (5 of 10 minuten). Deze bepalingen zijn ongevoelig voor trombocyten aantallen tot minstens $200 \times 10^9/l$ (CLSI H21-A5, 2008).

Moderne centrifuges zijn met een thermostaat uitgerust. De aanbevolen temperatuur voor het centrifugeren van bloed voor stollingsbepalingen is “kamertemperatuur” (CLSI H21-A5, 2008). Van centrifugeren bij lagere temperaturen (4°C , 12°C) is inmiddels beschreven dat er geen significant effect op de aPTT, PT, Fbg en D-dimeren resultaten is gevonden (Lippi *et al*, 2006). Het risico op koude activatie van bijvoorbeeld factor VII overwegend lijkt een temperatuurgebied tussen koelkast- en kamertemperatuur ($13 - 21^\circ\text{C}$) daarom acceptabel.

Na centrifugeren wordt het plasma voorzichtig afgepipetteerd met een plastic pipet. Bloedplaatjes en/of bloedcellen kunnen de gevoeligheid van de bepaling van Lupus Anticoagulans beperken, in het bijzonder na invriezen van plasmamonsters. Voor de bepaling van Lupus Anticoagulans geldt daarom de eis dat het plasma “bloedplaatjesvrij” moet zijn (CLSI H21-A5, 2008).

Dit plasma kan voorafgaand aan het invriezen op verschillende manieren worden bereid:

1. door het afgepipetteerde plaatjesarme plasma nogmaals op dezelfde wijze te centrifugeren en over te brengen in een schone buis. NB: het plasma moet voorzichtig worden afgepipetteerd zonder het gesedimenteerde materiaal te beroeren.
2. door het afgepipetteerde plasma 5 minuten bij $10.000 \times g$ te centrifugeren in een microcentrifuge en over te brengen in een schone buis. NB: het plasma moet voorzichtig worden afgepipetteerd zonder het gesedimenteerde materiaal te beroeren
3. door het afgepipetteerde plasma langzaam te filtreren door een $0,2 \mu\text{m}$ celluloseacetaat filter. Deze methode is niet voor alle stollingstesten geschikt (selectieve verwijdering van factor V, VIII, IX, XII en von Willebrand factor) en wordt daarom afgeraden (CLSI H21-A5, 2008).

7. Hemolytische monsters

Na centrifugering van het bloed dient het verkregen plasma te worden geobserveerd om mogelijke hemolyse te detecteren. Hemolyse kan plaatsvinden in vivo (intravasculaire hemolyse) of in vitro gedurende of na het vullen van de bloedafnamebuis. Bij rode cel lysis komen behalve hemoglobine (Hb) ook andere intracellulaire en membraancomponenten vrij in het plasma.

In sommige stollingsanalyzers met foto-optische eindpuntdetectie kunnen problemen ontstaan met monsters die vrij Hb of andere stoffen bevatten die lichttransmissie kunnen storen (CLSI, 2008). Ieder laboratorium dient zelf na te gaan of dit van toepassing is op eigen reagens-apparaat combinatie, tenzij dit beschreven is in de literatuur (Molenaar *et al*, 2011).

De door hemolyse vrijgekomen intracellulaire en membraancomponenten kunnen stollingsfactoractivatie veroorzaken. Er is een tendens naar verkorte PT en APTT in gehemolyseerde monsters van patiënten (Laga *et al*, 2006). Volgens Lippi *et al* (2006) wordt het resultaat van routine stollingsbepalingen (PT, APTT en Fbg) minder betrouwbaar bij in vitro hemolyse met een vrij Hb concentratie $> 0.1 \text{ mMol/l}$.

Indien er sprake is van intravasculaire hemolyse waarbij de mogelijke stollingsactivatie past bij de toestand van de patiënt, kan het monster in behandeling worden genomen.

Indien er sprake is van in vitro hemolyse met een vrij Hb concentratie > 0.1 mMol/l, dient het monster niet in behandeling te worden genomen.

8. Bewaren van bloed en plasma

Zie tabel voor de verschillende bewaarcondities, *zoals aanbevolen door CLSI, en aangevuld met bevindingen uit de literatuur betreffende bewaarcondities bloedmonsters voor de bepaling van LAC (Brien et al, 1993; Brandt et al, 1995; Sletnes et al, 1992 en Greaves et al, 2000). In het algemeen wordt geadviseerd om tijdens transport van citraat volbloed dit niet te doen op ijs (2 – 8 °C) omdat hierbij mogelijk koude activatie kan optreden van factor VII, verlies van von Willebrand factor en een verstoring kan optreden in trombocyten (CLSI H21-A5, 2008).*

Gecentrifugeerde monsters voor de PT/PT-INR en van niet-gehepariniseerde patiënten voor de aPTT kunnen met het plasma op de cellen in een niet-geopende buis worden bewaard (Adcock et al, 1998; Van Geest-Daalderop et al, 2005).

Niet-gecentrifugeerde en gecentrifugeerde bloedmonsters voor de PT/PT-INR bepaling moeten, in een niet-geopende buis, bij 18 – 24 °C worden bewaard.

De bepaling moet binnen 24 uur worden uitgevoerd. Bewaren bij 2 – 4 °C kan koude activatie van factor VII geven, waardoor de resultaten van de PT kunnen veranderen. (CLSI H21-A5, 2008). Sommige PT reagens – apparaat combinaties zijn gevoeliger dan andere en geven na 24 uur of zelfs binnen 6 - 24 uur bewaren van niet-gecentrifugeerd bloed een grote verandering te zien, zowel bij kamertemperatuur als bij 4-6 °C (Van Geest-Daalderop et al, 2005); laboratoria wordt daarom aangeraden dit voor de eigen reagens – apparaat combinatie te controleren. Bloedmonsters voor de PT/PT-INR mogen niet langer dan 6 uur bij 37 °C worden bewaard, wat van belang is voor het transport per auto op warme dagen.

Bloedmonsters voor controle van ongefractioneerde heparine of laagmoleculair heparine dienen binnen 1 uur na de venapunctie te worden gecentrifugeerd en na centrifugeren en afpipetteren moet het plasma binnen 4 uur na venapunctie worden geanalyseerd. Tijdens voornoemde periode van 4 uur kan het plasma zowel bij een temperatuur van 2 – 4 °C of van 18 – 24 °C worden bewaard.

Naast deze aanbeveling voor bewaartermijn en –temperatuur (CLSI H21-A5, 2008; zie tabel) laten verschillende studies zien dat hier mogelijk wat meer rek in zit, voor zowel citraat volbloed als citraat plasma, voor wat betreft stabiliteit van bloedstollingsfactoren. Voor de aPTT en fibrinogeen worden bewaartermijnen beschreven tussen de 6 en 24 uur, en voor D-dimeer tussen de 24 en 48 uur (Hillyard et al, 1987; Gogstad et al, 1993; Ho & Wu 1991; Van Geest-Daalderop et al, 2005; Rao et al, 2000; Zürcher et al, 2008; Kemkes-Matthes et al, 2011; Adcock Funk et al, 2012 en Feng et al, 2014). Omdat de verschillen in reagens-apparaat combinaties bij deze studies mogelijk bijdragen aan deze gevonden verschillen in bewaartermijn, wordt aangeraden dit voor de eigen reagens-apparaat combinatie te controleren.

Indien het plasma langer moet worden bewaard, tot maximaal twee weken, moet het (plaatjesarm, zie 6.) ingevroren worden bij een temperatuur van -20°C of lager. Plaatjesarm plasma, bewaard bij -70°C , is ten minste 12 maanden houdbaar (criterium: de uitkomst van individuele stollingstesten wijkt minder dan $\pm 10\%$ af van het uitgangresultaat) (CLSI H21-A5, 2008). Ook bij -70°C loopt de factor VIII:C activiteit echter langzaam terug (Woodhams *et al*, 2001). Het ingevroren plasma kan in een waterbad bij 37°C worden ontdooid totdat tenminste kamertemperatuur bereikt is. In de praktijk blijkt 5 minuten voldoende te zijn bij een volume van 1 ml plasma. Na mengen dient het monster onmiddellijk voor de bepalingen te worden gebruikt.

Tabel: Bewaar temperatuur van citraatbloed, gecentrifugeerd en afgepipetteerd citraatplasma en ingevroren citraatplasma en 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- dimeer	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

REFERENTIES

Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA.

Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 105-110.

Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA.

The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 463-470.

Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA.

Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing. Dependence on citrate concentration. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:595-599.

Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ.

Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38:1-10.

Boss DS, Hackeng CM, Vlot EA, van Loon D.

Het effect van buizenpost op stolling- en hemolyseparameters: "To walk or not to walk". *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2015; 40: 234-238.

Brien WF, Schaus MR, Cooper KE, O'Keefe BT, Inwoon M.

Lupus anticoagulant testing: effect of platelet count on the activated partial thromboplastin time. *Br J Biomed Sc* 1993; 50: 114-116.

Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I.

Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1185-1190.

Capel P, Chatelain B, Leclercq R, Lust A, Masure R, Arnout J.

Quality control in haemostasis. *Acta Clinica Belgica* 1992; 47: 308-318.

CLSI: Procedures for the collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard-sixth Edition. *CLSI document H3-A6.2007*

CLSI guideline:

Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; Approved guideline – Fifth Edition. H21-A5. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Contant G, Gouault-Heilmann M, Martinoli JL.

Heparin inactivation during blood storage: its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole –C.T.A.D. mixture-. *Thromb Res* 1983; 31:365-374.

Feng LM, Zhao Y, Zhao HC, Shao ZX.

Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014; 4:3868

Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL.

Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. *Am J Clin Pathol.* 2005;124:902-909.

Gogstad GO, Dale S, Brosstad F, Brandsnes Ø, Holtlund J, Mørk E, Gärtner E, Borch SM.

Assay of D-dimer based on immunofiltration and staining with gold colloids. *Clin Chem* 1993 ; 39 :2070-2076.

Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I.

Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109: 704-715.

Ho CH, Wu S-Y.

The influence of time, temperature and packed cell on activated partial thromboplastin time and prothrombin time. *Thromb Res* 1991; 62: 625-633.

Hope E, Mayorga SR, Robinson S, Goldberg L, Leveson JE, Marengo-Rowe AJ, Peerschke EIB.

Preparation of plasma for coagulation testing. Evaluation of the StatSpin high-speed centrifuge. *Laboratory Medicine* 1991; 22: 190-193.

Hillyard CJ, Blake AS, Wilson K, Rylatt DB, Miles S, Bunch R, Elms MJ, Barnes A, Bundesen PG.

A latex agglutination assay for D dimer: evaluation and application to the diagnosis of thrombotic disease. *Clin Chem* 1987; 33:1837-1840.

Iversen LH.

Pre-analytical variation in the measurements of sensitive markers of coagulation and fibrinolysis: the influence of venipuncture and mixing of blood.

Haemostasis 1997; 27: 119-124.

Kemkes-Matthes B, Fischer R, Peetz D.

Influence of 8 and 24-h storage of whole blood at ambient temperature on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, thrombin time, antithrombin and D-dimer.

Blood Coagul Fibrin 2011;22:215-220.

Laga AC, Cheves TA, Sweeney JD.

The effect of specimen hemolysis on coagulation test results.

Am J Clin Pathol 2006; 126:748-755.

Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC.

Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing.

Arch Pathol Lab Med 2006; 130:181-184.

Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC.

Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16: 453-458.

Lippi G, Salvagno GL, Poli G, Guidi GC.

Influence of centrifugation temperature on routine coagulation testing. *Clin. Chem.* 2006; 52: 537-538.

Molenaar PJ, Leyte A.

Pre-acquisition system assessment of the Sysmex(®) Coagulation System CS-2100i and comparison with end-user verification; a model for the regional introduction of new analysers and methods. *Clin Chem Lab Med*

2011; 49: 1479-89

Peterson P, Gottfried EL.

The effects of inaccurate blood sample volume on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). *Thromb Haemost* 1982; 47:101-103.

Pretorius L, Janse van Rensburg WJ, Conradie C, Coetzee MJ.

Minimum citrate tube fill volume for routine coagulation testing.. *Int J Lab Hemat* 2014; 36: 493-495.

Raijmakers MTM, Menting CHF, Vader HL, Graaf F van der

Collection of blood specimens by venipuncture for plasma-based coagulation assays.

Necessity of a discard tube.

Am J Clin Pathol 2010; 133: 331-335

Rao LV, Okorodudu AO, Petersen JR,

Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions.

Clin Chim Acta 2000; 300: 13-21

Ray MJ, Carroll PA, Just SJE, Hanson GAT.

A low volume specimen container suitable for monitoring the aPTT of heparinized patients. *Blood Coagul Fibrinol* 1993; 4: 805-807.

Reneke J, Ezzell J, Leslie S, Ng VL, Gottfried EL.

Prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time due to underfilled specimen tubes with 109 mmol/l (3.2%) citrate anticoagulant.

Am J Clin Pathol 1998; 109: 754-757.

Sletnes KE, Gravem K, Wisloff F.

Preparation of plasma for the detection of lupus anticoagulants and antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 1992; 66: 43-53.

Van den Besselaar AMHP, Chantarangkul V, Tripodi A.

A comparison of two sodium citrate concentrations in two evacuated blood collection systems for prothrombin time and ISI determination. *Thromb Haemost* 2000 ; 84 :664-667.

Van den Besselaar AMHP, Rutten WPF, Witteveen E.

Effect of magnesium contamination in evacuated blood collection tubes on the prothrombin time test and ISI calibration using recombinant human thromboplastin and different types of coagulometer. *Thromb Res* 2005 ; 115 :239-244.

Van den Besselaar AMHP, van Zanten AP, Brantjes HM, Elisen MGLM, van der Meer FJM, Poland DCW, Sturk A, Leyte A, Castel A.

Comparative study of blood collection tubes and thromboplastin reagents for correction of INR discrepancies: a proposal for maximum allowable magnesium contamination in sodium citrate anticoagulant solutions.

Am J Clin Pathol 2012; 138:248-254.

Van Geest-Daalderop JHH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJM, Hoekstra MMCL, Van den Besselaar AMHP.

Preanalytical variables and off-site blood collection : influences on the results of the prothrombin time/international normalized ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy. *Clin Chem* 2005 ; 51 :561-568.

Ver Elst K, Vermeiren S, Schouwens S, Callebaut V, Thomson W, WeekX S. Validation of minimal citrate tube fill volume routine coagulation test on ACL TOP 500 CTS. *Int Jnl. Lab. Hem.* 2013; 35: 614-619

Walker ID.

Blood collection and sample preparation: pre-analytical variation. In: J Jespersen, RM Bertina, F Haverkate (editors), 2nd revised edition of ECAT assay procedures. *A manual of laboratory techniques. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999; pp 21-28*

Werkgroep Infectiepreventie. Richtlijn Algemene Huidinfectie 2003. *Www.wip.nl.*

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin.

Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229-236.

Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L.

Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008; 99: 416-426.

Appendix

De verhouding van 1 deel natriumcitraat op 9 delen bloed geeft de juiste antistolling bij hematocriet-waarden, die rond 0,45 l/l liggen (0,20 – 0,55). Bij afwijkende Ht-waarden dient de verhouding te worden aangepast en moet er aan het vaste volume citraat in de buis respectievelijk meer ($Ht > 0,55$ l/l) of minder ($Ht < 0,20$ l/l) bloed worden toegevoegd. Het uitgangspunt bij de berekeningen is dat het plasmavolume dat aan een vast volume citraat wordt toegevoegd constant blijft. Het citraat verdeelt zich alleen over het plasma en niet over de bloedcellen.

Bij een afnamebuis, die 0,5 ml citraat bevat en waarin 4,5 ml bloed ($Ht = 0,45$ l/l) wordt afgenomen, is de berekening als volgt:

$$\begin{aligned} \text{Plasmavolume} &= (1 - Ht) \times \text{bloedvolume} = (1 - 0,45) \times 4,5 \\ \text{voeg toe: } &4,5 \times (1 - 0,45) / (1 - Ht) \text{ ml bloed, dus } 4,5 \text{ ml bloed.} \end{aligned}$$

Bijv.: $Ht = 0,16$ l/l:

$$\text{voeg toe: } 4,5 \times (1 - 0,45) / (1 - 0,16) = 2,9 \text{ ml bloed}$$

Bijv.: $Ht = 0,78$ l/l:

$$\text{voeg toe: } 4,5 \times (1 - 0,45) / (1 - 0,78) = 11,3 \text{ ml bloed}$$

In de praktijk is een afwijkende Ht van het bloed meestal pas bekend na centrifugeren van de afnamebuis.

Bij een hoge Ht ($> 0,55$ l/l) betekent dit, dat er ten opzichte van het in de buis aanwezige volume citraat te weinig bloed is afgenomen en zal veelal een nieuwe afname dienen plaats te vinden van de juiste, berekende hoeveelheid bloed.

Bij een lage Ht ($< 0,20$ l/l) is er juist sprake van een relatief tekort aan citraat en dient dit tekort te worden aangevuld volgens onderstaande berekening.

Bij een bloedvolume = 4,5 ml is de benodigde hoeveelheid citraat:

$$0,5 \times (1 - Ht) / (1 - 0,45) = \text{ml citraat}$$

Bijv. bij: $Ht = 0,16$ l/l is de benodigde hoeveelheid citraat:

$$0,5 \times (1 - 0,16) / (1 - 0,45) = 0,76 \text{ ml citraat}$$

Er bevond zich al 0,5 ml citraat in de buis, dus er moet $0,76 - 0,5 = 0,26$ ml citraat worden toegevoegd aan het bloed-citraat mengsel.

Bij een normale Ht is er derhalve sprake van:

0,5 ml citraat per 4,5 ml bloed

ofwel 0,5 ml citraat per $4,5 \times (1 - 0,45) = 2,48$ ml plasma

ofwel 0,20 ml citraat per ml plasma.

Bij een Ht van 0,16 l/l geldt: 0,5 ml citraat per 4,5 ml bloed

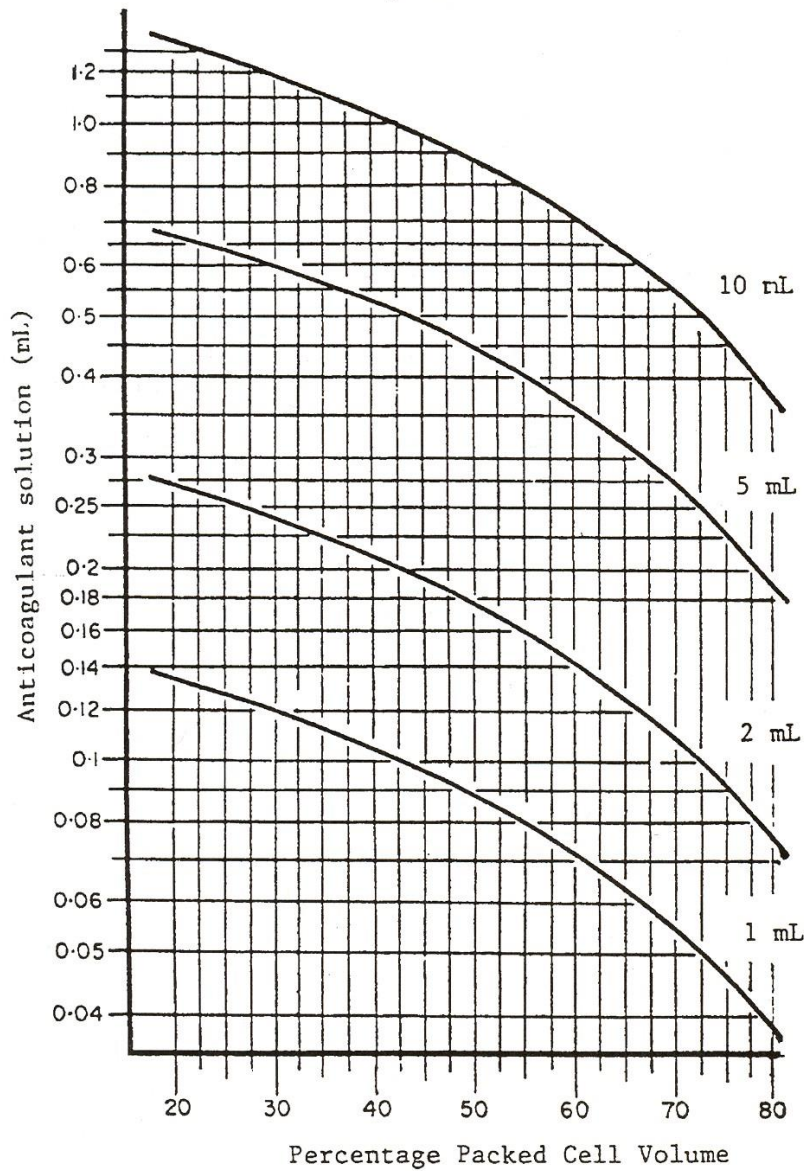
ofwel 0,5 ml citraat per $4,5 \times (1 - 0,16) = 3,78$ ml plasma

ofwel 0,13 ml citraat per ml plasma

De uiteindelijk aan het citraatplasma toe te voegen hoeveelheid citraat is dan bij een Ht van 0,16 l/l:

$0,20 - 0,13 = 0,07$ ml citraat per ml plasma.

Reagents



Select the curve for the total volume of anticoagulated blood required (10, 5, 2, or 1 mL). Enter the chart at the patient's packed cell volume on the horizontal axis and read off the corresponding volume of anticoagulant solution on the vertical axis. Place the volume in a collection tube and add blood up to the required total volume. The chart assumes a normal packed cell volume of 43%; in that case, 1 volume of anticoagulant is made up to 10 volumes with blood.

Alternatively, the anticoagulant volume may be calculated from the expression:

$$X = (100 - PCV) / (595 - PCV) \text{ vol,}$$

where, X is the volume of anticoagulant required to prepare unit volume of anticoagulated blood, and PCV is the packed cell volume in %; e.g., to determine the volume required for 5 mL anticoagulated blood, calculate 5 x mL.

(Reproduced from Ingram, G.I.C., Brozovic, M., and Slater, N.G.P. Bleeding disorders, investigations and management, 2nd edition. Blackwell's Scientific Publications, Oxford: pp. 244-245, 1982, by permission of the authors and publishers.)

CLSI H21-A5