

## RAPPORT NKKs PREANALYTISK EKV-PROGRAM 2012 – Preanalytiske forhold vedrørende koagulasjonsanalysene APTT, INR, Fibrinogen og D-dimer

### Innledning

Opptil 0,5 % av alle prøvesvar er beheftet med feil og de fleste av disse (opptil 70 %) oppstår i den preanalytiske fasen (Bonini P 2002, Lippi G 2007). Det er derfor viktig å kvalitetssikre denne del av analyseprosessen. Preanalytiske forhold vedrørende koagulasjonsanalyser har vært trukket frem som spesielt følsom for feil (McCraw A 2010 og Carraro P 2012) og det har også vært et ønske fra våre deltakere at NKK skal fokusere på dette. NKK har derfor ønsket å kartlegge preanalytiske forhold for koagulasjonsanalyser ved norske laboratorier for å avdekke problematiske områder, se om det er stor variasjon i prosedyrer og i hvor stor grad CLSI retningslinjene følges. Vi ønsker å oppfordre laboratoriene til å følge retningslinjene, men vi ser at de ikke alltid er like klare og at enkelte anbefalinger kan være praktisk vanskelig å følge. I tillegg antydes det i CLSI retningslinjene at de er konservative og at man kan gå bort fra anbefalingene dersom man gjør egne studier. Det er kommet nye studier etter at CLSI retningslinjene ble publisert i 2008, men vi ser at det fortsatt er et behov for gode studier i dette feltet for å kunne gi tydelige anbefalinger.

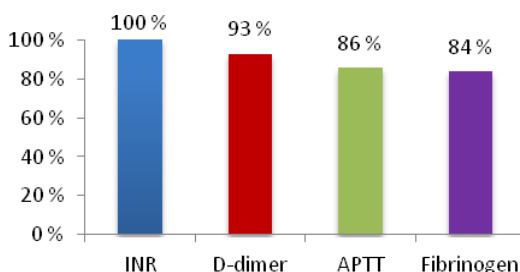
### Generelle opplysninger

Det preanalytiske programmet i 2012 besto av et spørreskjema vedrørende preanalytiske forhold for de mest vanlige koagulasjonsanalysene APTT, INR, Fibrinogen og D-dimer. Deltakere i koagulasjonsprogrammet N00008 ble forespurt om å delta (69 deltakere). Spørreskjemaet ble sendt ut til de 59 laboratoriene som ønsket å delta og 57 besvarte skjemaet.

Denne rapporten gir en oppsummering av deltakernes svar. Rapporten er utarbeidet av Gunn Kristensen (leder NKK) og Ann-Helen Kristoffersen (overlege LKB, Haukeland universitetssykehus) og i tillegg har Solveig Vannes (fagansvarlig bioingeniør ved koagulasjonsseksjon, LKB, Haukeland universitetssykehus) og Anne Stavelin (Bioingeniør/PhD student NOKLUS) lest gjennom og kommentert. Faktabokser viser anbefalinger fra CLSI (H21-A5 og H3-A6) med utfyllende kommentarer der det er relevant. For å kunne sammenligne egne svar med svar fra andre laboratorier og med anbefalingene, er det lagt ved en pdf-fil av eget svar.

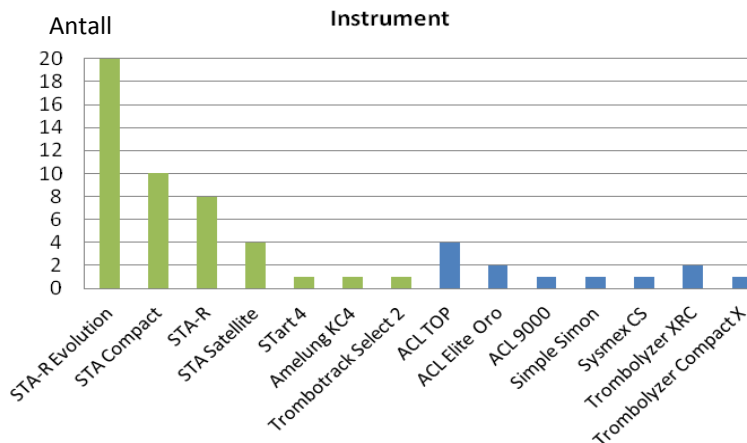
### Spørsmål 1-10

#### Hvilke koagulasjonsanalyser utfører dere ved ditt laboratorium?

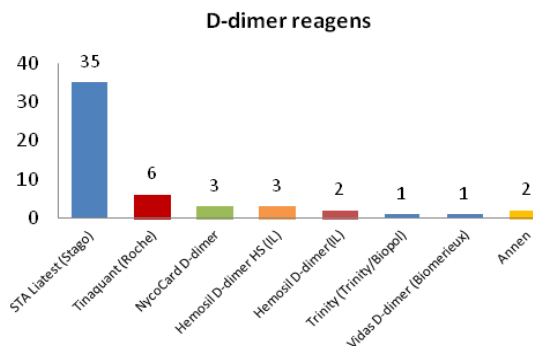
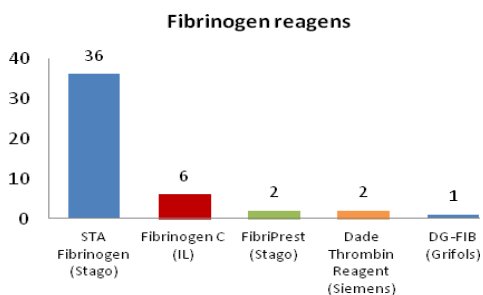
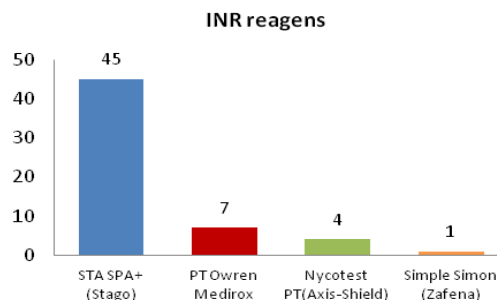
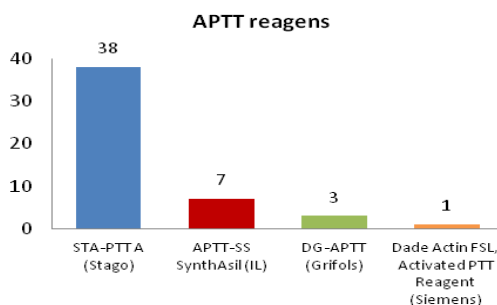


De fleste (82 %) utførte alle fire analysene og bare tre laboratorier utførte kun en av analysene. Tretten laboratorier utførte i tillegg andre koagulasjonsanalyser. Av disse var det flest som utførte Antitrombin (12 stk), aktivert protein C resistens (10 stk), Protein S (10 stk), Protein C (9 stk) og anti-faktor Xa (8 stk).

## Metodeinformasjon (instrument og reagens)



APTT, INR og fibrinogen er alle "klott"-analyser, dvs. at tiden til dannelse av koagel måles, mens D-dimer er en immunologisk analyse der avlesningen er optisk for alle instrumentene. Grønne kolonner viser antall instrument med mekanisk deteksjon av koagel og blå antall med optisk deteksjon av koagel. Mekanisk og optisk metode kan påvirkes noe ulikt av preanalytiske faktorer. Instrument med mekanisk deteksjon dominerer i Norge.

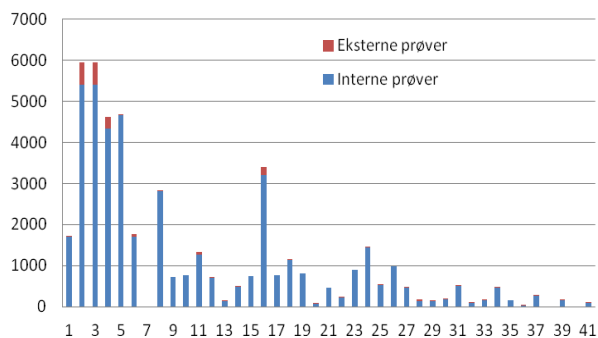


De fleste benytter STA instrument (74 %) og STA reagens (66-79 %) fra STAGO for alle fire analysene.

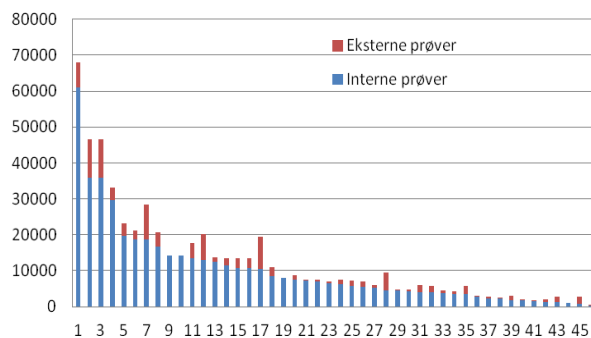
## Hvor mange analyser utfører dere internt og eksternt per år?

Figurene på neste side viser antall analyser per år (y-aksen) for det enkelte laboratorium (x-akse), og fordelingen mellom eksterne (rød del av kolonnene) og interne (blå del av kolonnene) prøver. Totalt 45 laboratorier svarte på dette spørsmålet. Det ble totalt utført **589 722 INR**, **109 511 D-dimer**, **52 911 APTT** og **40 478 Fibrinogen** analyser per år. Noen deltakere har oppgitt at estimatene er usikre og andre at de ikke kan skille mellom eksterne og interne prøver. I slike tilfeller er alle prøver registrert som interne. Tallene i figurene på neste side er derfor usikre.

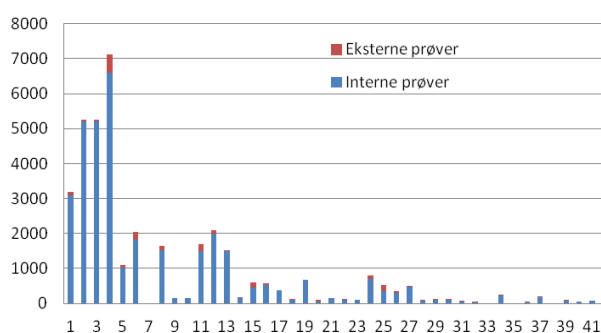
APTT - antall prøver per år for de enkelte laboratorier



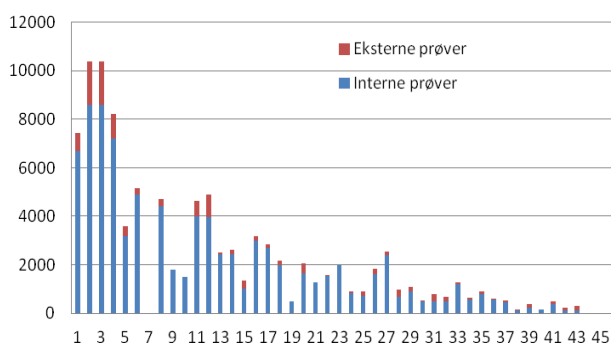
INR - antall prøver per år for de enkelte laboratorier



Fibrinogen - antall prøver per år for de enkelte laboratorier



D-dimer - antall prøver per år for de enkelte laboratorier



## Rutiner for blodprøvetaking (spm 11-19)

### Hvilke type rør brukes til koagulasjonsanalyser?

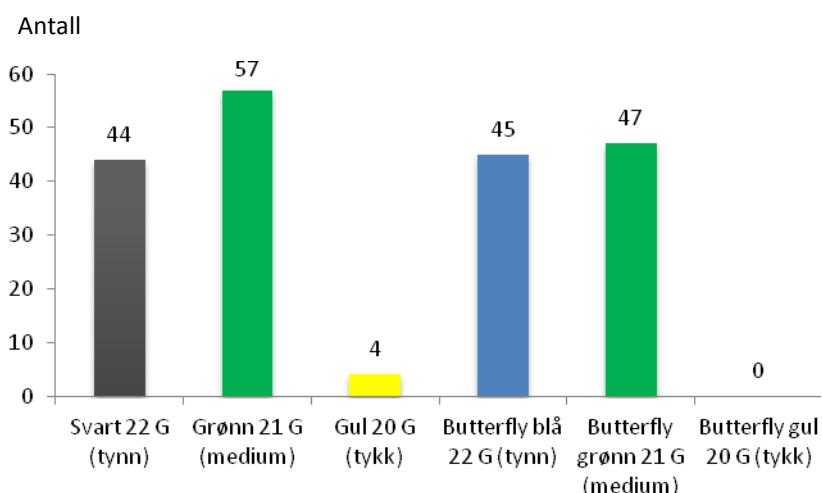
De aller fleste (98 %) benytter 3,2 % Na-citrat rør som anbefales i dag. Kun 4 stk oppga at de fremdeles bruker 3,8 % Na-citrat rør og to av disse brukte også 3,2 %.

**Anbefaling CLSI (H21-A5): 3,2 % Na-citrat anbefales.** Rør med 3,8 % Na-citrat kan benyttes, men 3,2 og 3,8 % rør bør ikke benyttes om hverandre da 3,8 % rør kan gi lengre koagulasjonstider enn 3,2 % rør. CDTA rør er akseptable, men andre antikoagulantia (f.eks EDTA rør) er ikke anbefalt.

**Kommentar:** Flere studier har vist at APTT og PT/INR kan bli høyere i 3,8 % rør sammenlignet med 3,2 % rør (Adcock DM 1997, Duncan EM 1994, Danielson CFM 1997). Årsaken er antatt å være at økt citratkonsentrasjon (3,8 %) binder mer tilsatt kalsium, og at dette igjen gir lengre koagulasjonstider. Forskjellen mellom 3,2 % og 3,8 % ser ut til å være delvis avhengig av reagens og av om pasienten er under behandling med antikoagulantia (Adcock DM 1997). Dersom laboratoriet får tilsendt 3,8 % rør etter overgang til 3,2 % rør bør man be disse rekvirentene om å gå over til 3,2 % rør så snart som mulig.

Rør med 3,8 % Na-citrat kan være mer følsomme for underfyllning enn 3,2 % rør (Adcock DM 1998).

**Hvilken type nål brukes ved prøvetaking til koagulasjonsanalyser?** (NB! I dette spørsmålet kunne man velge flere alternativ)

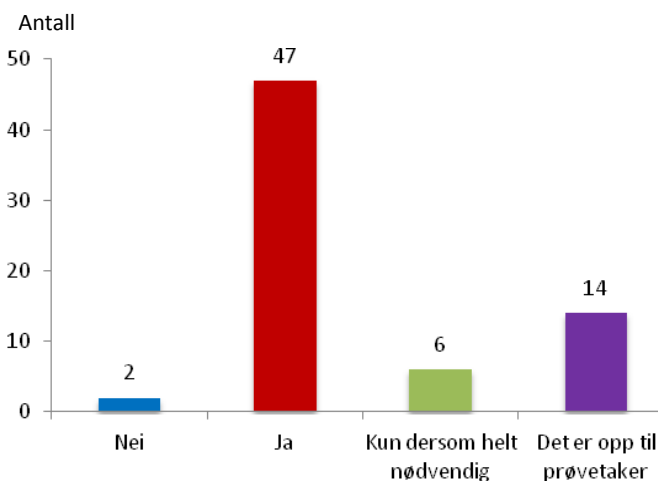


Det blir hovedsaklig benyttet grønn 21 G (medium) både vanlig og butterfly. Ved vanskelig prøvetaking benyttes tynnere nål; de aller fleste bruker da svart 22 G (tynn) eller butterfly blå 22 G (tynn).

**Anbefaling CLSI (H21-A5):** Ideelle nåler er 19 – 21 G, men mindre nåler kan være nødvendig hos barn og ved vanskelig prøvetaking. Nåler av tykkelse > 24 G (tynne) kan gi hemolyse og aktivere plater, mens < 16 G (tykke) kan medføre turbulensindusert hemolyse.

**Kommentar:** Ingen brukte de nålene som er frarådet å bruke (< 16G eller > 24G).

**Brukes stase under prøvetaking til koagulasjonsanalyser?** (NB! I dette spørsmålet kunne man velge flere alternativ)



De fleste benytter stase under prøvetaking og resultatet gis vanligvis ut uten kommentar. Imidlertid er det flere som presiserer at de etterstreber minst mulig stase. Hvis prøvetaking er problematisk og man har brukt langvarig stase skriver flere at de ville gitt kommentar.

**Anbefaling CLSI (H3-A6):** Stase bør ikke overskride 1 minutt.

**Kommentar:** Stase < 1 minutt gir ikke klinisk signifikante endringer i rutine koagulasjonsanalyser (APTT, INR, Fibrinogen og D-dimer) (Lippi 2005). Dersom lenger stase er benyttet bør dette kommenteres, og eventuelt bør ny prøve tas.

### Brukes kasteglass ved prøvetaking til koagulasjonsanalyser?

Vel en tredel svarer at de ikke bruker kasteglass, mens de resterende bruker kasteglass ved bruk av butterfly. Noen kommenterer at de selvsagt også bruker kasteglass ved prøvetaking fra arteriekran, CVK og lignende, og en ved utredning av trombosedens, men dette ble det egentlig ikke spurt om i denne undersøkelsen.

**Anbefaling CLSI (H21-A5):** Kasteglass skal benyttes ved bruk av butterfly og ved prøvetaking fra kateter (ulike prosedyrer er avhengig av type kateter og om det er saltvann eller heparin i kateteret).

Ved vanlig prøvetaking (ikke butterfly eller kateter) ser det ikke ut til å være nødvendig med kasteglass for APTT og INR, men for andre analyser er det usikkert om det er nødvendig eller ikke.

**Kommentar:** Kasteglass ved butterfly er viktig for å unngå underfylte prøverør (dødvolum i slangen), og dette er spesielt viktig ved bruk av delvolumsrør. Ved prøvetaking fra kateter må kasteglass benyttes for å unngå fortykning og/eller forurensing av heparin. Ved vanlig prøvetaking finnes det flere studier som viser at kasteglass ikke er nødvendig for APTT, INR, Fibrinogen og D-dimer (Lippi G 2004, Rosenson RS 1998, Gottfried EL 1997, Adcock DM 1997, Yawn PB. 1996 Bamberg R 2003, Brigden ML 1997) og en studie som viser at det ikke er nødvendig for en hel rekke andre koagulasjonsanalyser (Smock KJ 2010).

### Hvilken rekkefølge av prøverør brukes ved venøs prøvetaking?

Rekkefølgen er rangert etter gjennomsnitt av alle deltakerne (gjennomsnittsverdi vises i parentes):

#### RAPPORTERT:

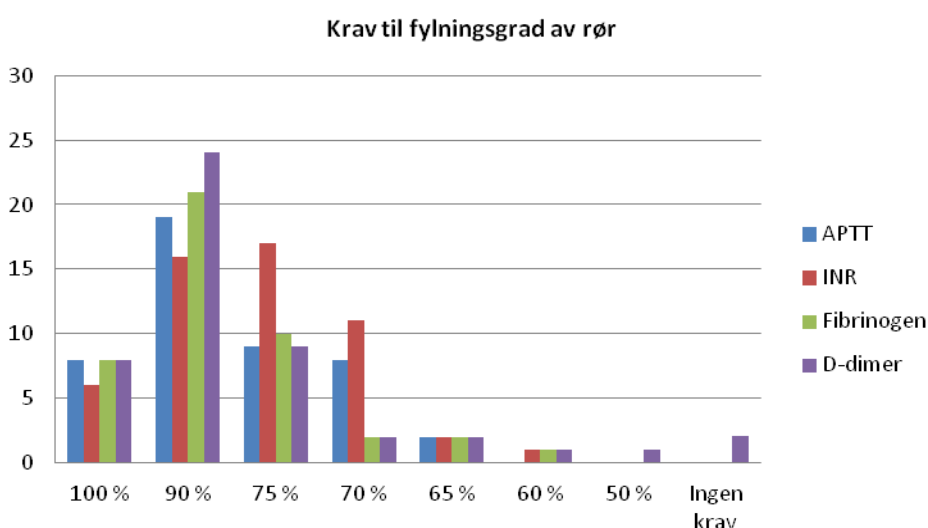
1. Rør til blodkultur (1,0)
2. Natriumcitratrør til koagulasjonsanalyser (2,4)
3. Rør uten tilsetning (2,7)
4. Rør uten tilsetning m/klottaktivator (4,1)
5. Serum m/gel (4,4)
6. Heparinrør (5,8)
7. EDTA-rør (6,4)
8. Natriumcitratrør til SR (7,4)

#### Anbefaling CLSI (H3-A6)

1. Rør til blodkultur
2. Natriumcitratrør til koagulasjonsanalyser
3. Serumrør m/u koagulasjonsaktivator
4. Serumrør med eller uten gel
5. Heparinrør med eller uten gel
6. EDTA-rør med eller uten gel
7. Rør med glykolysehemmer
8. Andre rør

**Kommentar:** Det er godt samsvar mellom det som er rapportert og anbefalingen.

### Hvilke krav har dere til hvor fullt prøveglasset må være?



Dersom kravet ikke er oppfylt vil de aller fleste (98 %) avvise prøven og be om ny prøve mens ett laboratorium svarer at resultatet vil gis ut uten kommentar. Enkelte laboratorier kommenterte at de ville godta lavere fylningsgrad enn det de oppga, og anga et lavere tall. Det laveste tallet ble da registrert.

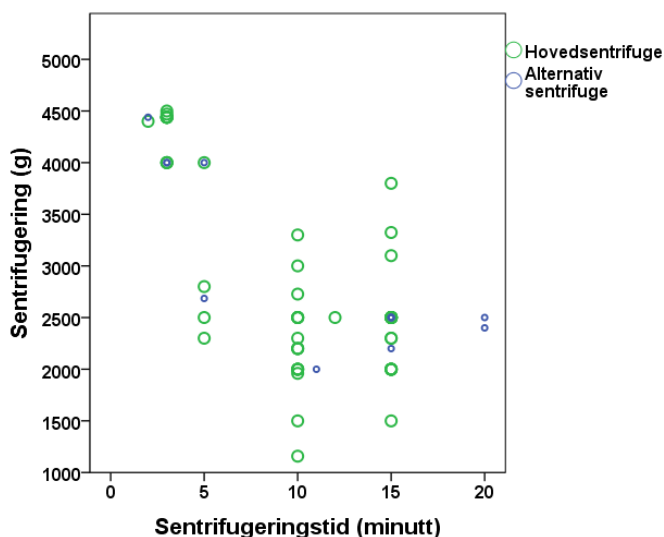
**Anbefaling CLSI (H21-A5):** Kravet til fylning er  $\geq 90\%$ , men  $< 90\%$  kan godtas dersom det er gjort egne undersøkelser. Ved underfylning (fylning under grensen oppgitt av laboratoriet) skal prøven avvises.

**Kommentar:**

**Underfylning** fører til økt citratkonsentrasjon og dermed økt binding av kalsium. Underfylning gir i tillegg en økt fortykning av prøven. Begge faktorer fører til at koagulasjonstiden kan øke. Ulike studier har konkludert med ulike krav til fylningsvolum (Peterson P 1982, Reneke J 1998, Adcock DM 1998, Chuang J 2004, Lippi G 2012). Studier tyder på at små rør er mer følsomme for underfylning enn større, 3,8 % rør er mer følsomme enn 3,2 % rør, ulike reagens kan påvirkes ulikt av underfylning og APTT ser ut for å være mer følsom for underfylning enn INR og fibrinogen. Egne studier, der alle analysene er inkludert, bør utføres dersom CLSI kravene ikke følges.

**Overfylning** bør unngås. Overfylning kan oppstå dersom man fjerner korken og tilsetter blodet direkte i citratrøret. Dette kan føre til at det blir vanskelig å blande blodet med citrat, noe som kan resultere i dannelse av koagel.

### Behandling av prøven før analysering (spm 20-23)



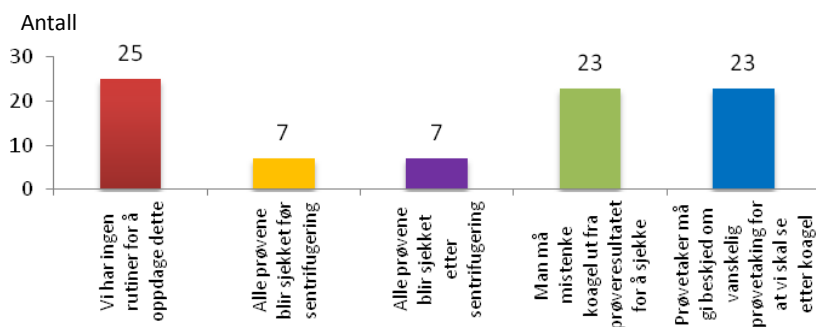
Svært mange ulike kombinasjoner av sentrifugeringskraft (g) og tid ble oppgitt. Flere hadde både en hovedsentrifuge og en alternativ sentrifuge (13/55 (24 %)). Spredningen i sentrifugeringskraft og tid var omtrent like stor for hoved- og alternativ sentrifuge. Enkelte kommenterer at de benytter StatSpin (4000 – 4500 g i 2-5 min) ved haste INR. Enkelte benytter kun StatSpin.

**Anbefaling CLSI (H21-A5):** Sentrifugering ved minst 1500g i minst 15 minutt for å få tilstrekkelig platefattig plasma ( $< 10 \times 10^9/L$ ). Sentrifugen bør testes før bruk og valideres hver 6. måned med tanke på at platefattig plasma oppnås. Høyere kraft og kortere tid kan benyttes.

**Kommentar:** Det ser ut til at APTT, INR, Fibrinogen og D-dimer ikke påvirkes av høye platetall (opp mot  $200 \times 10^9/L$ ) dersom analyseringen skjer rett etter sentrifugering (Barnes 2002, Carroll 2001 og Lippi G 2007), og at høyere kraft (g) og kortere sentrifugeringstid kan benyttes uten påvirkning av disse resultatene (Sultan A 2010, Dimeski G 2011, Nelson S 1994, Pappas A 1991 og Hope E 1991). Det er imidlertid usikkert om platetall  $> 10 \times 10^9/L$  kan godtas dersom prøvene blir stående til senere analysering/etterbestilling eller dersom de skal fryses. Vi anbefaler derfor at platefattig plasma ( $< 10 \times 10^9/L$ ) bør benyttes for alle koagulasjonsanalyser der det kan være aktuelt med senere analysering/etterbestilling og frysing, og for koagulasjonsanalyser som ikke er nevnt over, siden det ikke finnes studier. NB! Ved analysering av Lupus antikoagulant (LA) og APTT til monitorering av heparinbehandling er det helt nødvendig med platefattig plasma ( $< 10 \times 10^9/L$ ) (se egne retningslinjer for LA, diskuteres ikke i detalj her).

## Rutiner for å oppdage faktorer som kan påvirke analyseresultatet (spm 24-34)

Hvordan oppdages koagel i prøven? (NB! I dette spørsmålet kunne man velge flere alternativ)

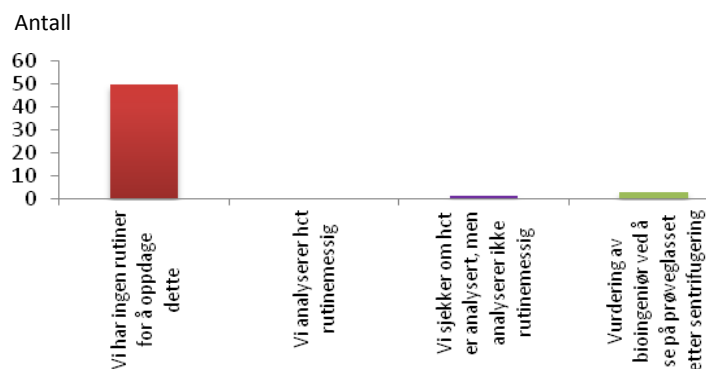


Flere deltakere hadde valgt flere alternativ: Blant annet hadde 8 deltakere svart både "Vi har ingen rutiner for å oppdage dette" og " Prøvetaker må gi beskjed om vanskelig prøvetaking for at vi skal se etter koagel", 7 deltakere hadde svart både "Vi har ingen rutiner for å oppdage dette" og " Man må mistenke koagel ut fra prøveresultatet for å sjekke" mens 4 hadde svar både " Prøvetaker må gi beskjed om vanskelig prøvetaking for at vi skal se etter koagel" og " Man må mistenke koagel ut fra prøveresultatet for å sjekke". De aller fleste (96-98 %) vil avvise og be om ny prøve dersom man oppdager koagel i prøven.

**Anbefaling CLSI (H21-A5):** Prøver med koagel må avvises.

**Kommentar:** Koagel i prøven kan oppdages ved inspeksjon av prøven før og etter sentrifugering. Koagel i prøven kan føre til forbruk av koagulasjonsfaktorer eller aktivering av koagulasjonsfaktorer og plater, og kan gi forlengede eller forkortede koagulasjonstider (Adcock Funk DM 2012). Funn av koagel (uansett størrelse) skal derfor føre til avvisning og ny prøvetaking (Adcock Funk DM 2012). Koagel kan for eksempel være forårsaket av problematisk prøvetaking, voldsom risting av prøven, forsinket blanding av blod med citrat i prøverøret eller vanskelig blanding pga overfylning.

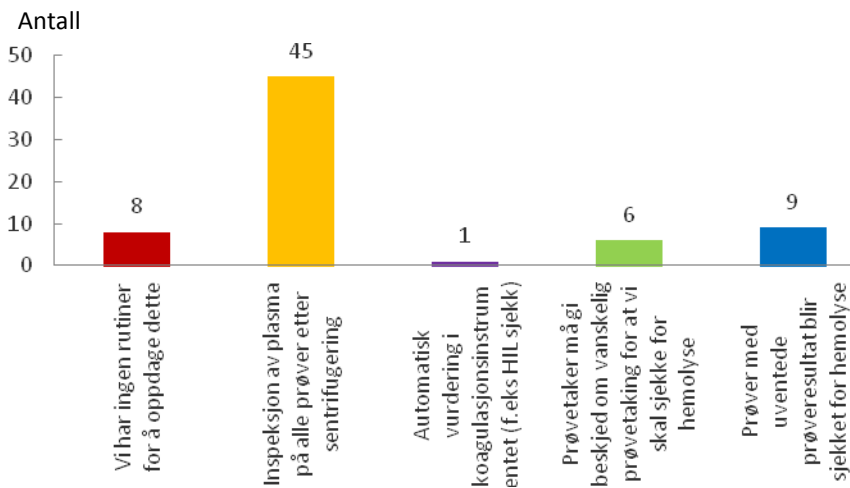
Hvordan oppdages evt. avvikende hematocrit (hct)?



De fleste laboratorier har ingen rutiner for å oppdage avvikende hct og de fleste gir ut resultatet uten kommentar. Kun en deltaker svarer at de sjekker om hct er analysert, og dersom hct er lav korrigeres svaret med en faktor ("faktorisering").

**Anbefaling CLSI (H21-A5):** Citratkonsentrasjonen bør justeres når hematokrit (hct) verdien er høy (> 55 %). Det finnes formler for å justere citratkonsentrasjonen etter hct-verdien, men vanligvis kan 0,1 mL citrat fjernes fra prøverøret siden de fleste høye hct-verdier vil være mellom 55 og 65 %. Ingen tilgjengelige data støtter anbefaling om å justere citratkonsentrasjonen dersom hematocrit er lav (< 20 %).

**Kommentar:** Ved høy hct (> 55 %) kan koagulasjonstidene øke (citratkonsentrasjonen øker i forhold til plasma (som ved underfylning)), og APTT og INR kan bli falskt økt, mens fibrinogen kan bli falskt lav (Marlar RA 2006). Det finnes ingen tilgjengelige data som støtter anbefaling om å justere for lav hct (< 20 %) (Siegel JE 1998). Det er problematisk å skulle følge CLSI anbefalingen om justering av citratkonsentrasjonen i og med at man ikke rutinemessig sjekker hct verdi hos alle pasienter, og fordi man benytter ferdig produserte citratrør (Moraglio D 1996).



En del deltakere hadde valgt flere alternativ: Fem deltakere hadde svart "Inspeksjon av plasma på alle prøver etter sentrifugering" og "Prøver med uventede prøveresultat blir sjekket for hemolyse", fire hadde svart "Inspeksjon av plasma på alle prøver etter sentrifugering" og "Prøvetaker må gi beskjed om vanskelig prøvetaking for at vi skal sjekke for hemolyse", en hadde svart "Vi har ingen rutiner for å oppdage dette" og "Inspeksjon av plasma på alle prøver etter sentrifugering" mens to hadde svart "Vi har ingen rutiner for å oppdage dette" og "Prøvetaker må gi beskjed om vanskelig prøvetaking for at vi skal sjekke for hemolyse".

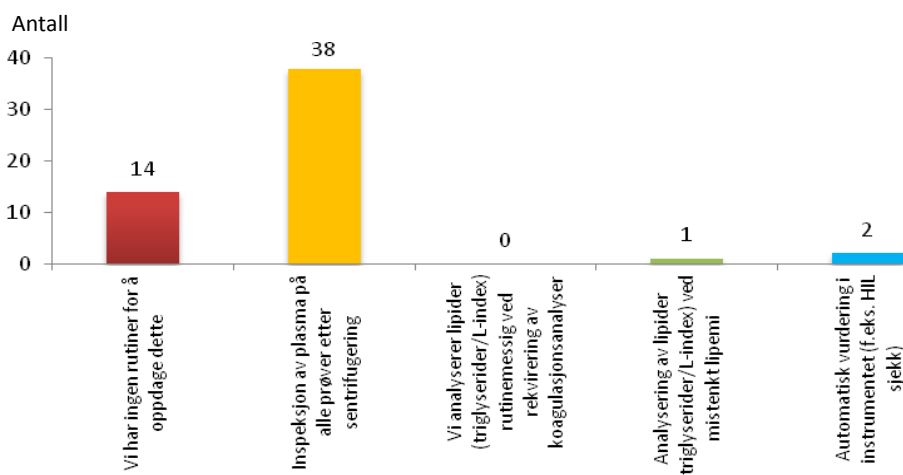
Av de som besvarer dette spørsmålet (ca 35 stk) vil 1/3 avvise prøven (tendens til at flere vil avvise for D-dimer enn for APTT/INR/Fibrinogen) og be om ny, 1/3 gir ut resultatet med kommentar og 1/3 gir ut uten kommentar. I tillegg skriver svært mange en kommentar. 14 stk skriver at prøven blir avvist dersom sterk hemolyse, og flere skriver at grad av hemolyse vurderes og at de gir ut resultatet ved svak eller moderat hemolyse. Noen få skriver at resultatet gis ut dersom innenfor referanseintervall, dersom ikke problematisk prøvetaking eller dersom ingen feilmelding fra instrumentet. 2 stk skriver at hemolyse ikke er noen feilkilde for disse analysene.

**Anbefaling CLSI (H21-A5):** Prøver med sterk hemolyse må avvises både ved bruk av optisk og mekanisk deteksjon av koagel. Ved hemolyse frigjøres intracellulære- og membran-komponenter (fosfolipider) som kan føre til aktivering av koagulasjonsfaktorer. Denne aktiveringen kan påvirke resultatet av koagulasjonsanalyser. Det er ikke enighet i litteratur angående påvirkning av hemolyse på resultatene av koagulasjonsassay. Inntil flere studier foreligger anbefales det å avvise klart hemolyserte prøver. Lettere grad av hemolyse kan påvirke optisk koagel deteksjon.

**Kommentar:** To ulike studier viser at hemolyse kan interferere pga optisk interferens, men også fordi ulike cellekomponenter frigjøres ved hemolyse og påvirker koagulasjonsanalysene, men de to studiene er ikke helt enige om hvordan effekten av hemolyse påvirker resultatet (Laga AC 2006, Lippi G 2006). Inntil flere studier foreligger anbefales det å avvise hemolyserte prøver (Lippi G 2007b og Lippi G 2008). Eventuelt kan opplysninger i pakningsvedlegget eller informasjon fra produsent benyttes, men det kan være problematisk å forholde seg til oppgitte grenser for hemolyse så lenge man ikke analyserer fritt hemoglobin/H-index på alle prøver eller prøver med synlig hemolyse (kan analyseres på klinisk kjemi instrumenter, evt. på koagulasjonsinstrumenter med automatisk sjekk for hemolyse.) Det er viktig å merke seg at hemolyse kan påvirke APTT, INR og Fibrinogen også på andre måter enn optisk interferens (som nevnt over), og at man derfor ikke kan se bort fra påvirkning ved bruk av instrument med mekanisk deteksjon av koagel. For D-dimer analysering er målemetoden optisk (immunologiske metoder) for alle instrument, og det er den optiske interferensen ved hemolyse som påvirker.

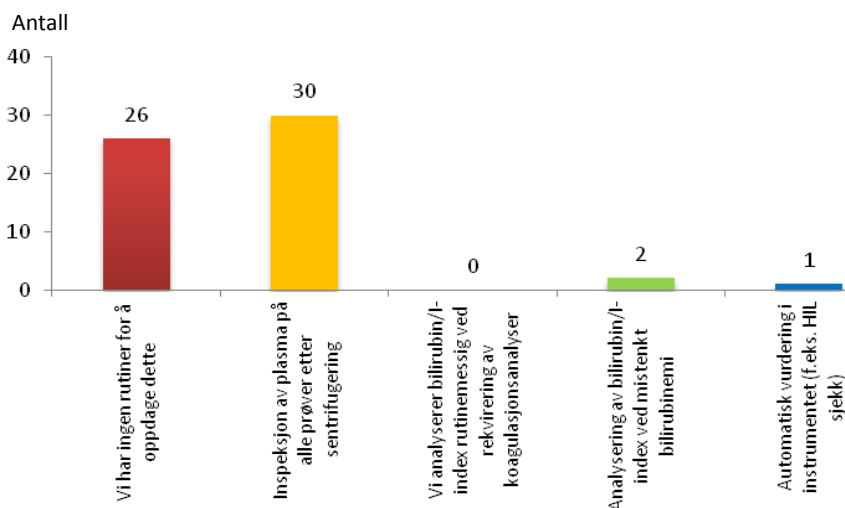


### Hvordan oppdages lipemi? (NB! I dette spørsmålet kunne man velge flere alternativ)



Dersom det ble oppdaget lipemi i prøven ville de fleste (70-80 %) gitt ut resultatet uten kommentar for analysene APTT, INR og fibrinogen. For D-dimer ville 36 % gitt ut resultatet uten kommentar, mens 25 % ville avvist prøven og bedt om ny. Mellom 13 og 17 % ville gitt ut svaret med kommentar dersom lipemi ble oppdaget (for alle analysene).

### Hvordan oppdages bilirubinemi? (NB! I dette spørsmålet kunne man velge flere alternativ)



En del deltakere hadde valgt flere alternativ. To deltakere hadde svart både "Vi har ingen rutiner for å oppdage dette" og "Inspeksjon av plasma på alle prøver etter sentrifugering", mens to hadde svart både "Analysering av bilirubin/l-index ved mistenkt bilirubinemi" og "Inspeksjon av plasma på alle prøver etter sentrifugering". De fleste (63-88 %) ville gitt ut svaret uten kommentar for alle analysene. For D-dimer ville 16 % avvist prøven og bedt om ny.

**Anbefaling lipemi og bilirubinemi CLSI (H21-A5):** Ingen klar anbefaling, men de skriver at noen instrumenter som benytter optisk deteksjon av koagel (APTT, INR, Fibrinogen) kan ha problemer med prøver med bilirubinemi, lipemi eller andre substanser som interfererer med lys transmisjon. Inntil publiserte studier foreligger eller laboratoriet har validert sine prosedyrer anbefales mekaniske eller elektromekaniske metoder for deteksjon av koagel ved lipemi eller bilirubinemi.

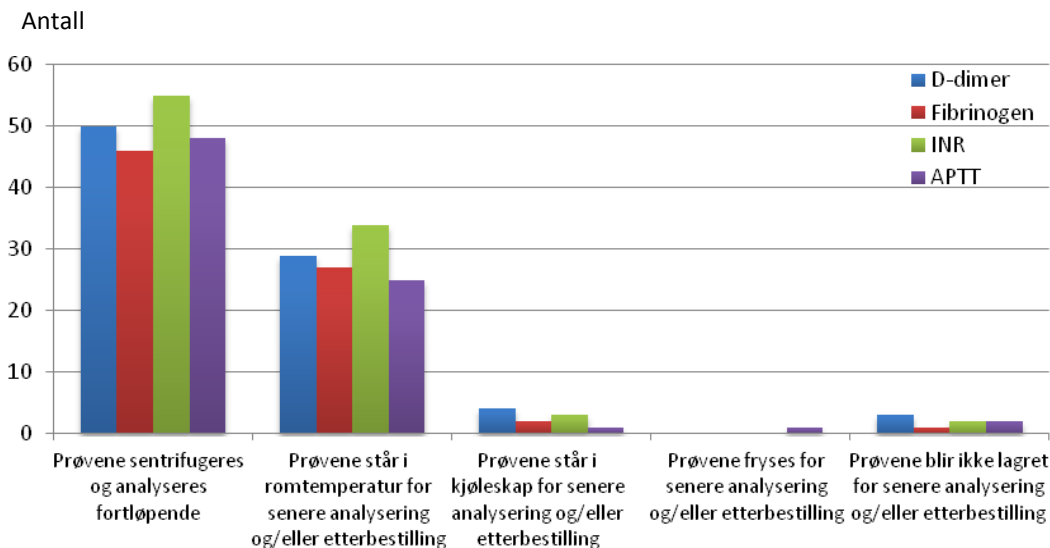
**Kommentar:** Inntil publiserte studier foreligger anbefales det å avvise prøver der det er lipemi eller bilirubinemi ved optisk deteksjon. Det er imidlertid problematisk at bilirubinemi kan være vanskelig å oppdage ved visuell inspeksjon (Lippi G 2007b). Dersom pakningsvedlegget oppgir grenser for interferens kan man eventuelt analysere bilirubin på klinisk kjemi instrument i laboratoriet ved mistanke, men igjen er problemet å velge ut hvilke prøver man skal gjøre dette på dersom man ikke skal analysere dette på alle prøver. Lipemi kan man oppdage ved inspeksjon av citratblod eller plasma, men for å bestemme konsentrasjon må dette analyseres på klinisk kjemi instrumenter. Det er få laboratorier i Norge som har tilgang til automatisk vurdering av hemolyse, bilirubinemi på sine koagulasjonsinstrument. Husk at D-dimer alltid analyseres ved optisk og vil kunne påvirkes av hemolyse, bilirubinemi og lipemi uavhengig av type instrument.

**Oversiktsartikkel anbefaler følgende som gjelder for flere av spørsmålene over:**

Alle blodprøver bør inspiseres før og etter sentrifugering. Før sentrifugering, sjekk for riktig prøverør, fylningsvolum og koagel/fibrintråder. Etter sentrifugering, sjekk for koagel, hemolyse, bilirubinemi, lipemi (McCraw A 2010, Adcock Funk DM 2012).

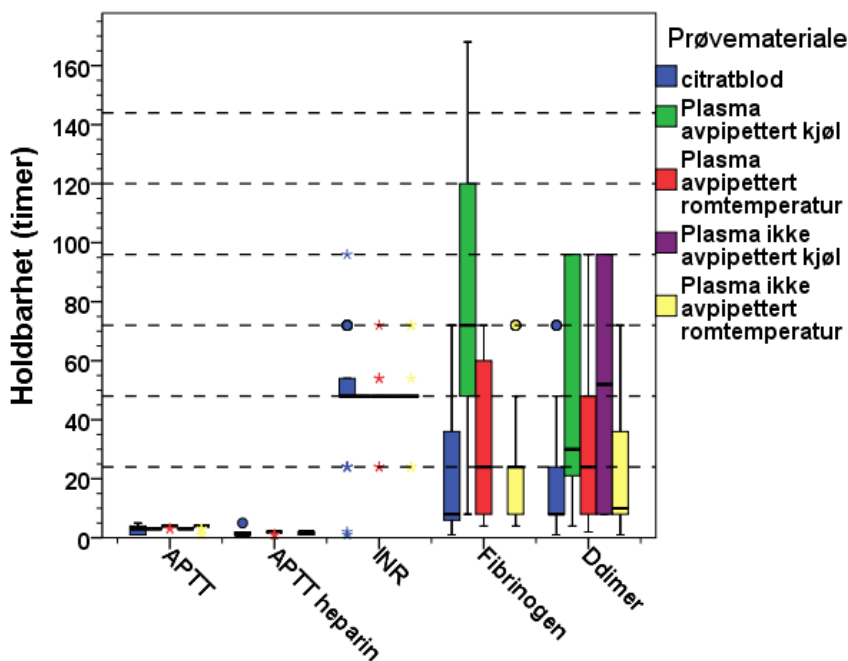
**Avpipettering, lagring og holdbarhet av prøver (spm 35-42)**

**Oppbevaring og lagring av prøver (NB! I dette spørsmålet kunne man velge flere alternativ)**



De fleste oppga at de sentrifugerer og analyserer fortløpende, men omtrent halvparten lar i tillegg prøvene stå i romtemperatur for senere analysing og/eller etterbestilling. Svært få lar prøvene stå i kjøleskap. Svært få avpipetterer prøvene før analysing og før lagring i romtemperatur og kjøleskap.

**Holdbarhet citratblod, ikke avpipettert og avpipettert plasma**



**Forklaring boxplot:**

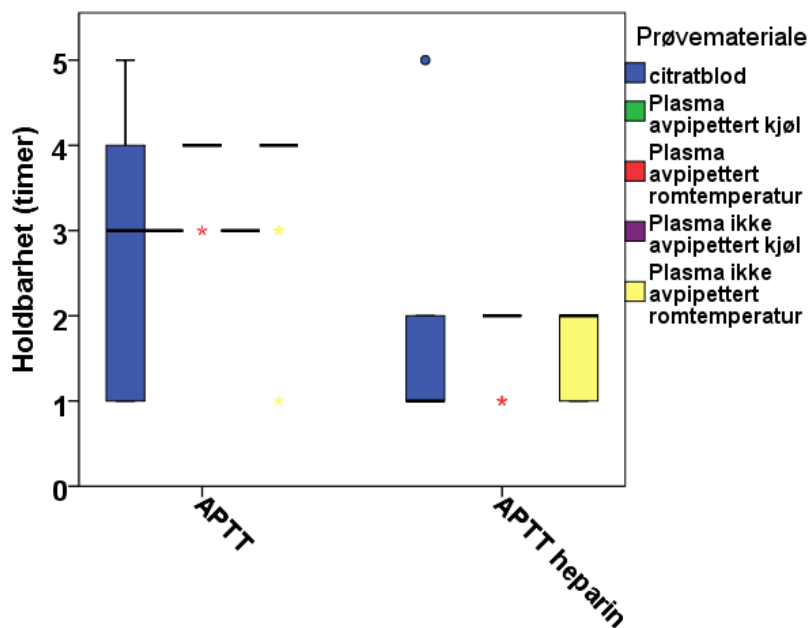
Selve boksen inneholder 50 % av alle resultatene. Linjen i midten av boksen er medianverdi og kantene på boksen er 25- og 75-percentiler. Linjene ut fra boksen representerer spredningen i resultatene. Sirkler og stjerner er outliere. Der det kun er en linje (enkelte medianer for APTT og INR) er svarene i stor grad like.

Stiplede linjer i figuren er antall døgn (nederste linje 24 timer (1 døgn), neste linje 48 timer (2 døgn) osv).

Opggitt holdbarhet for APTT (med og uten heparinbehandling) er svært kort, og det er derfor laget en figur (se under) der det er enklere å se detaljene. Spredningen for oppgitt holdbarhet for APTT og APTT heparin er liten. Det er også forholdsvis liten spredning i oppgitt holdbarhet for INR, men for enkelte prøvematerialer er det svært få som har svart. Spredningen på oppgitt holdbarhet for Fibrinogen og D-dimer er svært stor (se figur forrige side). Opggitt median holdbarhet for APTT var 3-4 timer (se figur under), for APTT heparin 1-2 timer (se figur under), for fibrinogen 8-72 timer og for D-dimer 8-52 timer avhengig av prøvemateriale (se figur forrige side). Opggitt median holdbarhet for INR er 48 timer uavhengig av prøvemateriale (se figur forrige side).

### Holdbarhet citratblod, ikke avpipettert og avpipettert plasma for APTT med og uten heparinbehandling

Figuren under representerer de samme tallene for APTT med og uten heparinbehandling som figuren over, men y-aksen er forskjellig.



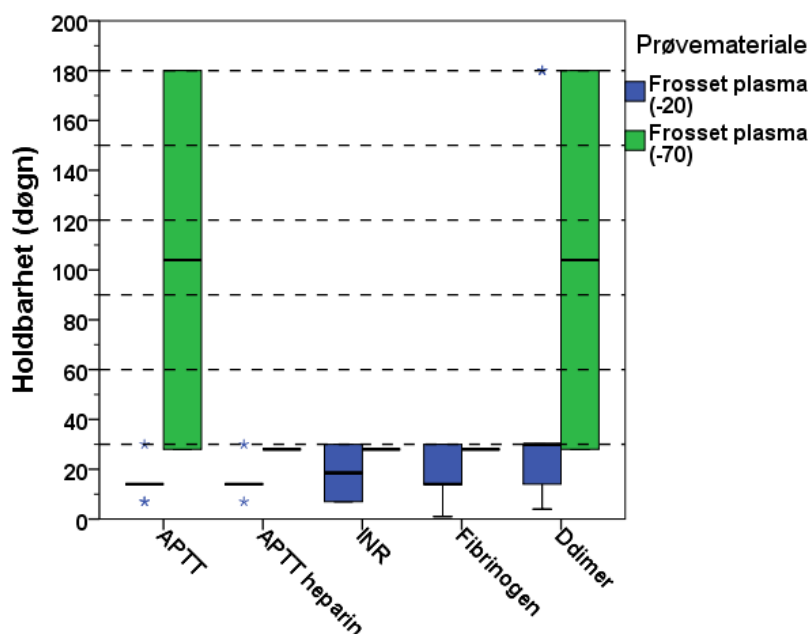
#### Forklaring boxplot:

Selve boksen inneholder 50 % av alle resultatene. Linjen i midten av boksen er medianverdi og kantene på boksen er 25- og 75-percentiler. Linjene ut fra boksen representerer spredningen i resultatene. Sirkler og stjerner er outliere.

Y-aksen er antall timer og x-aksen viser analysene APTT og APTT for pasienter behandlet med heparin (ufraksjonert).

Der det kun er en linje (median) er svarene like, men for enkelte av prøvematerialene er det få som har svart.

### Holdbarhet frosset plasma (-20°C og -70°C)



#### Forklaring boxplot:

Selve boksen inneholder 50 % av alle resultatene. Linjen i midten av boksen er medianverdi og kantene på boksen er 25- og 75-percentiler. Linjene ut fra boksen representerer spredningen i resultatene. Sirkler og stjerner er outliere.

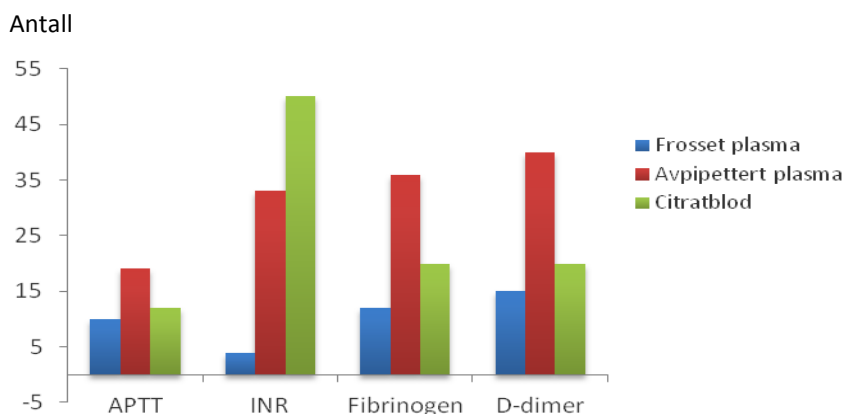
Der det kun er en linje (median) er svarene like, men for enkelte av prøvematerialene er det få som har svart.

Stiplede linjer i figuren er antall måneder (nederste linje 1 måned (30 døgn), neste linje 2 måneder (60 døgn) osv).

Det var færre laboratorier som svarte på spørsmålet om holdbarhet for frosset plasma enn for citratblod/fersk plasma, men dette henger sannsynligvis sammen med at det var svært få som sa at de pleier å fryse plasma til rutineanalyser. Det var stor spredning i oppgitt holdbarhet i minus 70 grader for APTT og D-dimer, med en median holdbarhet mellom 3 og 4 måneder. Spredningen i oppgitt holdbarhet i minus 20 grader var mindre (median 2 - 4 uker).

## Tilsendte prøver (spm 43-47)

### Hvilket prøvemateriale aksepteres tilsendt



Mange deltakere hadde valgt flere alternativ. For eksempel aksepterte 10 deltakere både citratblod og avpipettert plasma tilsendt for APTT, 31 for INR, 19 for Fibrinogen og 19 for D-dimer.

82 % som mottar tilsendt citratblod svarer at de alltid sentrifugerer og analyserer ankomstdag. Cirka 20 % svarte at de mottar tilsendt plasma ofte mens de fleste svarte at de enten aldri eller bare av og til mottar tilsendt plasma. De fleste som mottar tilsendt plasma ville analysert det ankomstdag uten resentrifugering (ca 70 %). Svært få ville analysert tilsendt plasma etter ankomstdag.

**Anbefaling CLSI (H21-A5) (citratblod og plasma):** Holdbarheten for de fleste koagulasjonsanalysene er 4 timer i citratblod/citratplasma, unntak er INR som har lengre holdbarhet (24 timer) og APTT fra pasienter som behandles med ufraksjonert heparin (sjelden i dag) som har kortere holdbarhet i citratblod (kun 1 time i citratblod, men 4 timer i citratplasma).

**Kommentar:** I ulike holdbarhetsstudier for citratblod og/eller plasma er det funnet både lengre og kortere holdbarhet enn det som CLSI oppgir. For APTT er det i ulike studier funnet en holdbarhet på mellom 6 og 24 timer, for INR 6 – 72 timer, for Fibrinogen 8 timer – 7 dager og for D-dimer 24 - 48 timer (Adcock Funk DM 2012, Caliezi C 2000, Zurcher M 2008, Kemkes-Matthes B 2011, van Geest-Daalderop JHH 2005, Adcock D 1998, Awad MA 2004). Ulike reagens/instrument kombinasjoner kan i noen grad bidra til å gi ulike resultater, men i noen tilfeller er forskjellene er større enn det som kan forventes kun ut fra dette. På grunn av de store forskjellene anbefales det å gjøre forsøk på holdbarhet ved eget laboratorium for de prøvematerialer som benyttes (citratblod, ikke avpipettert plasma (plasma på cellene) og avpipettert plasma) med egne reagens/instrument kombinasjoner. Prøvene må da behandles slik de ville blitt behandlet for reelle pasientprøver.

Prøvene som står for senere analysering bør stå med korken på/dekkes godt til. Dersom de oppbevares uten kork vil tap av CO<sub>2</sub> og økt pH kunne gi økning av APTT og INR (Adcock Funk DM STH 2012).

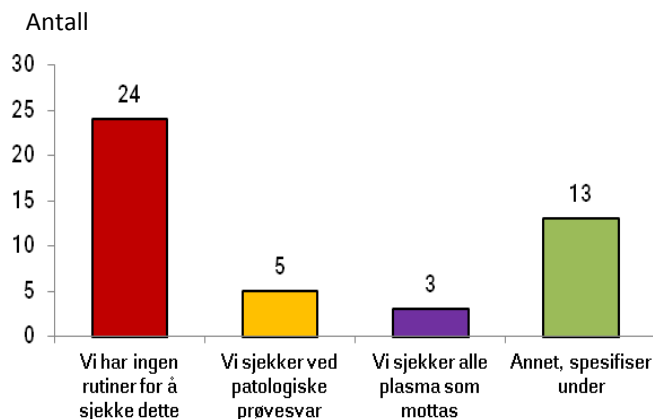
**Anbefaling CLSI (H21-A5) (kjøl):** Citratblod til koagulasjonsanalyse bør ikke stå i kjøleskap (2-8 grader C) eller lagres på is. Plasma er holdbart 4 timer i kjøleskap (bortsett fra plasma til INR analyse som ikke bør kjøles).

**Kommentar:** Kjøling av citratblod kan gi aktivering av faktor VII som kan gi redusert INR og degradering av faktor VIII (og von Willebrand faktor) som kan påvirke APTT. Høye temperaturer kan gi degradering av faktor V og faktor VIII (Adcock Funk DM STH 2012). Det anbefales temperaturkontroll i rom der prøvene oppbevares.

**Anbefaling CLSI (H21-A5) (frys):** Ved frysing av plasma (minus 20 grader C) gjelder 2 ukers holdbarhet for de fleste koagulasjonsanalyser og 6 - 18 måneder i minus 70 grader C, noe avhengig av analytt.

**Kommentar:** Koagulasjonsanalyser er mindre holdbare ved frysing ved minus 20 grader C enn ved minus 70 grader C (Adcock Funk DM STH 2012). Ulike studier gir noe ulik holdbarhet også når det gjelder frysing (Woodhams B 2001, Alesci S 2008 og Bohm-Weigert M 2010).

### Når avpipetert plasma mottas - hvordan sjekkes det at det er citratplasma?



De fleste oppga at de ikke har noen rutiner for å sjekke at det er citratplasma (og ikke serum, EDTA plasma eller annet prøvemateriale). Angående de som svarte "annet", så ville flere analysert fibrinogen for å sjekke at det var citratplasma (fibrinogen finnes ikke i serum) og de fleste skrev at de som sendte prøver skulle merke prøven med at det var citratplasma.

**CLSI:** Ingen kommentar om dette.

**Kommentar:** Dersom man mottar avpipetert plasma kan man ikke se på prøvematerialet om det er citratplasma eller annet avpipetert prøvemateriale (EDTA plasma, serum?). Man kan mistenke feil prøvemateriale ut fra resultatene, men ikke alltid (Favaloro EJ STH 2008). Ved mistanke om at man har mottatt serum kan fibrinogen analyseres (serum inneholder ikke fibrinogen). Det finnes algoritmer der man analyserer ulike elektrolytter for å sjekke om det er citratplasma som er mottatt (Lippi G 2010). Det vil være ressurskrevende å gjøre dette på alle plasma som ankommer, men det kan være til hjelp i enkelte tilfeller der man har mistanke om feil prøvemateriale.

## Avsluttende konklusjoner og oppsummering:

Vi anbefaler at CLSI retningslinjene følges der dette er praktisk mulig, men vi ser at det har kommet nye studier etter at CLSI anbefalingene ble publisert i 2008. Så langt det er mulig har vi påpekt dette. Det er flere områder der det ikke finnes gode studier, og derfor gir ikke CLSI alltid sterke anbefalinger, og de åpner opp for at man kan gå bort fra anbefalingene dersom egne forsøk er utført.

### Anbefalinger fra NKK:

- 3,2 % citratrør bør brukes. Ved tilsendte 3,8 % citratrør anbefaler vi at det tas kontakt med rekvirenten for å anbefale dem å gå over til 3,2 %.
- Unngå langvarig stase (> 1 minutt).
- Unngå oppbevaring av citratblod på kjøll/is.
- Ved bruk av butterfly eller prøvetaking fra kateter skal kasteglass benyttes (obs egne rutiner v/kateter!).
- Kasteglass er ikke nødvendig ved vanlig prøvetaking.
- Ved koagel må prøven avvises.
- Ved sterk hemolyse må prøven avvises.
- Svak hemolyse
  - Konferer pakningsvedlegg for den enkelte metode/analyse. Egne forsøk kan eventuelt utføres ved å analysere hemolytiske plasma (uten å gi ut resultatet) og deretter sammenligne med resultater fra prøve på samme pasient mottatt innen 4 timer etter første prøve (ikke mulig ved APTT heparinbehandling).
- Sentrifuger må sjekkes med tanke på platetall i plasma etter sentrifugering.
  - Dersom platetall etter sentrifugering er  $> 10 \times 10^9/L$  kan plasma kun benyttes til analysering av rutineanalyser (APTT, INR, Fibrinogen og D-dimer) rett etter sentrifugering. Skal ikke lagres for senere analysering eller etterbestillin uten at egne studier er gjennomført.
- Dersom fylningsgrad  $\geq 90\%$  fravikes må egne studier være utført for alle analyttene.
- Holdbarhet av citratblod, ikke avpipetert plasma og avpipetert plasma
  - På grunn av de store forskjellene i studier som er gjort og til dels manglende studier anbefales det å gjøre egne studier der alle analysene og de ulike prøvematerialene er inkludert.
- Bilirubinemi og Lipemi
  - Konferer pakningsvedlegg.

Effektene av en enkelt preanalytisk feil kan være stor for individuelle pasienter, selv om den ikke nødvendigvis alltid er av klinisk betydning hos alle. Det er derfor viktig å inkludere tilstrekkelig antall prøver når man utfører egne forsøk. Kombinasjonen av flere preanalytiske feil samtidig vil selvsagt kunne påvirke resultatet i større grad.

**NKK ønsker å øke kunnskapen angående preanalytiske forhold og koagulasjonsanalyser og når CLSI retningslinjene oppdateres vil vi gjøre NKK deltagerne oppmerksom på dette slik at eventuelle områder der det er stor usikkerhet kan oppdateres.**

### Spesielt nyttige oversiktsartikler:

#### CLSI anbefalinger og oversiktsartikler:

- Adcock D. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth edition. **H21-A5**. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008.
- Ernst JD. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard – Sixth Edition. **H3-A6**. Sixth edition ed. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
- McCraw A et al. Considerations in the laboratory assessment of haemostasis. *Haemophilia* 2010;16(suppl. 5):74-78
- Lippi G et al. Quality Standards for Sample Collection in Coagulation Testing *Semin Thromb Hemost* 2012
- Adcock Funk DM et al. Quality Standards for Sample Processing, Transportation, and Storage in Hemostasis Testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:1-10

### **Alfabetisk litteraturliste**

- 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 Jan;107(1):105-10.
- Adcock DM. Are discard tubes necessary in coagulation studies? *Laboratory Medicine*. 1997;28:530-3.
- Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence on citrate concentration. *Am J Clin Pathol*. 1998 May;109(5):595-9.
- Adcock DM et al. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9:463-70.
- Adcock D. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth edition. H21-A5. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2008.
- Adcock Funk DM et al. Quality Standards for Sample Processing, Transportation, and Storage in Hemostasis Testing. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:1-10.
- Alesci S et al. Effect of freezing method and storage at -                      -                      C on prothrombin time, APTT and plasma fibrinogen levels. *Thromb Res* 2008;124:121-6.
- Awad MA et al. Influence of Storage Time and Temperature on International Normalized Ratio (INR) Levels and Plasma Activities of Vitamin K Dependent Clotting Factors. *Hematology* 2004;9(5/6):333-337.
- Bamberg R, Cottle JN, Williams JC. Effect of drawing a discard tube on PT and APTT results in healthy adults. *Clin Lab Sci*. 2003 Winter;16(1):16-9.
- Barnes PW et al. Residual Platelet Counts in Plasma Prepared for Routine Coagulation Testing with Beckman Coulter Power Processor. *Lab Hematol* 2002;8:205-209.
- Bohm-Weigert M et al. Long- and short-term in vitro D-dimer stability measured with INNOVANCE\* D-dimer. *Thromb Haemost* 2010;103:461-5.
- Bonini P et al. Errors in Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2002;48(5):691-98.
- Brigden ML et al. Prothrombin time determination: the lack of need for a discard tube and 24-hour stability. *Am J Clin Pathol* 1997;108:422-6.
- Caliezi C et al. Agreement of D-dimer Results Measured by a Rapid ELISA (VIDAS) before and after Storage during 24h or Transportation of the Original Whole Blood Samples. *Thromb Haemost* 2000;83:177-8.
- Carraro P et al. Exploring the Initial Steps of the Testing Process: Frequency and Nature of Pre-Preanalytic Errors. *Clin Chem* 2012;58(3):638-42.
- Carroll WE et al. The Significance of Platelet Counts in Coagulation Studies. *J Med* 2001;32:83-96.
- Chuang J, Sadler MA, Witt DM. Impact of evacuated collection tube fill volume and mixing on routine coagulation testing using 2.5-ml (pediatric) tubes. *Chest*. 2004 Oct;126(4):1262-6.
- Danielson CFM et al. Effect of Citrate Concentration in Specimen Collection Tubes on the International Normalized Ratio. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:956-59.
- Dimeski G et al. Centrifugation protocols: tests to determine optimal lithium heparin and citrate plasma sample quality. *Ann Clin Biochem* 2011;48:218-22.
- Duncan EM et al. Effect of Concentration of Trisodium Citrate Anticoagulant on Calculation of the International Normalised Ratio and the International Sensitivity Index of Thromboplastin. *Thromb Haemost* 1994;72(1):84-8.
- Ernst JD. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard – Sixth Edition. H3-A6. Sixth edition ed. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
- Favaloro EJ et al. Preanalytical and Postanalytical Variables: The Leading Causes of Diagnostic Error in Hemostasis? *Semin Thromb Hemost* 2008;34(7):612-34.
- Gottfried EL, Adachi MM. Prothrombin time and activated partial thromboplastin time can be performed on the first tube. *Am J Clin Pathol*. 1997 Jun;107(6):681-3.
- Hope E. Preparation of plasma for coagulation testing: 13. evaluation of the StatSpin high-speed centrifuge. *Laboratory Medicine*. 1991;22:190-3.
- Kemkes-Matthes B et al. 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 Fibrinolysis* 2011;22:215-20.
- Laga AC, Cheves TA, Sweeney JD. The effect of specimen hemolysis on coagulation test results. *Am J Clin Pathol*. 2006 Nov;126(5):748-55.
- Lippi G et al. Effect of Specimen Collection on Routine Coagulation Assays and D-dimer Measurement. *Clin Chem* 2004;50(11):2150-52.
- Lippi G et al. Influence of short-term venous stasis on clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(8):869-75.

- Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Feb;130(2):181-4.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Manzato F, Guidi GC. Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007a Jul;18(5):525-8.
- Lippi G et al. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2007b;45(6):728-736.
- Lippi G et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab med* 2008;46(6):764-72.
- Lippi G et al. Right or wrong sample received for coagulation testing? Tentative algorithms for detection of an incorrect type of sample. *Int J Lab Hematol* 2010;32:132-37.
- Lippi G et al. Quality Standards for Sample Collection in Coagulation Testing *Semin Thromb Hemost* 2012 (Epub)
- Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol*. 2006 Sep;126(3):400-5.
- McCraw A et al. Considerations in the laboratory assessment of haemostasis. *Haemophilia* 2010;16(suppl. 5):74-78
- Moraglio D et al. Preanalytical phase in coagulation testing: state of the art in the laboratories of the Piedmont region, Italy. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:735-742.
- Nelson S, Pritt A, Marlar RA. Rapid preparation of plasma for 'Stat' coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med*. 1994 Feb;118(2):175-6.
- Pappas AA, Palmer SK, Meece D, Fink LM. Rapid preparation of plasma for coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med*. 1991 Aug;115(8):816-7. Peterson P et al. The effects of inaccurate blood sample volume on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). *Thromb Haemost* 1982;30;47(2):101-3. Reneke J et al. 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. Rosenson RS et al. Effects of tourniquet technique, order of draw, and sample storage on plasma fibrinogen. *Clin Chem* 1998 ;44(3):688-90. Siegel JE et al. Effect (or lack of it) of severe anemia on PT and APTT results. *Am J Clin Pathol* 1998;110(1):106-10. Smock KJ et al. Discard tubes are not necessary when drawing samples for specialized coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010;21:279-82.
- Sultan A. Five-minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing. *East Mediterr Health J*. 2010 Feb;16(2):233-6.
- Van Geest-Daalderop JHH et al. 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(3):561-68.
- Woodhams B et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12(4):229-36.
- Yawn BP, Loge C, Dale J. Prothrombin time: one tube or two. *Am J Clin Pathol*. 1996 Jun;105(6):794-7.
- Zurcher M et al. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008;99:416-26.