

Recomandările naționale ale Societății Croate de Biochimie și Medicină de Laborator pentru recoltarea, prelucrarea probelor de sânge, performanța testării și raportarea rezultatelor pentru testele screening de hemostază: timp de protrombină, timp de tromboplastină parțială activată, timp de trombină, fibrinogen și D-dimeri

Ana Bronić^{1*}, Desiree Coen Herak², Sandra Margetić¹, Marija Milić^{3,4}

1. Department of Clinical Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia
2. Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia
3. Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia
4. Faculty of Medicine, University of Osijek, Osijek, Croatia

ABSTRACT

Laboratoarele moderne de diagnostic dispun de un spectru larg de teste pentru hemostază utilizate în diagnosticarea și managementul pacienților cu tulburări hemostatice, în screeningul preoperator și în monitorizarea terapiei anticoagulante. Un studiu recent care a inclus laboratoarele de biochimie medicală și de transfuzie din Croația a evidențiat existența unor practici diferite în anumite etape ale procesului de testare a hemostazei și a evidențiat domeniile care necesită îmbunătățiri. Lipsa standardizării testelor, împreună cu nearmonizarea rezultatelor între diferite metode de măsurare, pot determina luarea unei decizii incorecte în tratamentul pacienților, compromițând astfel siguranța pacientului. Prin urmare, cu scopul de a sprijini laboratoarele să genereze rezultate exacte și de încredere, acest articol face recomandări cu privire la procedurile pentru fazele preanalitică, analitică și postanalitică ale celor mai comune teste de investigare a hemostazei: timpul de protrombină, timpul de tromboplastină parțială activată, timpul de trombină, fibrinogen și D-dimeri.

Cuvinte cheie: armonizare, ghiduri, standardizare, teste de coagulare, teste de hemostază

INTRODUCTION

Hemostaza reprezintă răspunsul fiziologic la o agresiune vasculară. Ea este rezultatul interacțiunii complexe dintre vase, plachete și factorii plasmatici ai coagulării, având drept funcție principală oprirea sângerării la locul leziunii, și menținerea sângelui în stare fluidă în vasele intacte [1].

Un diagnostic modern de laborator oferă o gamă largă de teste de coagulare utilizate în diagnosticul și managementul pacienților cu tulburări ale hemostazei, în bilanțul preoperator și în monitorizarea tratamentului anticoagulant [2]. Între acestea, timpul de protrombină

(PT), timpul de tromboplastină parțială activată (APTT) și dozarea fibrinogenului sunt cele mai comune teste screening care furnizează informații rapide (deși relativ nespecifice) despre natura perturbărilor hemostazei [3]. Rezultatele acestor teste screening, coroborate cu datele anamnestice și examenul clinic conduc ulterior spre selectarea unor teste de coagulare mai specifice. Există la ora actuală o gamă largă de teste disponibile, care folosesc o metodologie variată [4].

Lipsa standardizării testelor, precum și absența armonizării rezultatelor între diferitele tipuri de determinări pot conduce la decizii incorecte privind

* Autor corespondent / Corresponding author: Ana Bronić, Department of Clinical Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia. E-mail: anabronic@yahoo.com

Declaratie: Acest articol este traducerea în limba română a articolului "Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, fibrinogen and D-dimer" publicat în Biochem Med (Zagreb) 2019;29(2):020503, DOI 10.11613/BM.2019.020503, după obținerea acordului din partea Biochem Med (Zagreb). Autorii articolului nu sunt responsabili pentru acuratețea traducerii și nici nu au aprobat-o sau susținut-o în mod explicit. Pentru citarea acestui articol, vă rugăm să consultați publicația originală.

Disclaimer: This is a Romanian language translation of the article "Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, fibrinogen and D-dimer" published in Biochem Med (Zagreb) 2019;29(2):020503, DOI 10.11613/BM.2019.020503. Approval from Biochem Med (Zagreb) was secured prior to the publication of this translation. The authors of this article bear no responsibility for the accuracy of this translation and have neither endorsed nor approved its contents. For citation purposes, please refer to the original publication.

Traducere și adaptare în limba română: Ioana Brudașcă, Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj Napoca.

managementul pacienților, cu periclitatea siguranței acestora și apariția de costuri medicale adiționale [5].

Un sondaj efectuat în laboratoarele din Croația a arătat existența unor practici diferite în testarea hemostazei și a evidențiat aspecte care ar necesita îmbunătățiri [6]. Întrucât la nivel național se impune standardizarea și armonizarea testării hemostazei, în materialul de față sunt prezentate recomandări privind etapa preanalitică, analitică și postanalitică pentru PT, APTT, timpul de trombină (TT), fibrinogen și D-dimeri.

MATERIALE ȘI METODE

Recomandările privind etapa preanalitică, analitică și postanalitică pentru PT, APTT, timpul de trombină (TT), fibrinogen și D-dimeri au fost elaborate de Working Group for Laboratory Coagulation (WGLC) format de Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine (CSMBLM). Elaborarea acestor recomandări a fost făcută ca urmare a rezultatelor obținute în urma unui sondaj făcut în 2015 de WGLC în rândul laboratoarelor medicale și a laboratoarelor de transfuzie din Croația în care se efectuau teste de coagulare [6]. Datele din prezentul material au fost colectate din bazele de date PubMed și Ovid, precum și din publicații relevante ale Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), British Society for Haematology (BSH) și International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH).

Cuvintele cheie folosite pentru căutare au fost: pre-analytical, analytical and postanalytical phases of haemostasis or coagulation testing, coagulation assays, haemostasis assays, PT, international normalized ratio (INR), APTT, TT, fibrinogen, D-dimer test, haemostasis or coagulation assays guidelines, interpretation of results in coagulation standardization and/or harmonization in haemostasis testing.

ETAPA PREANALITICĂ ÎN TESTAREA HEMOSTAZEI

Faza preanalitică include toate procesele de la indicarea testului de către clinician până la momentul în care proba este gata pentru testare. Majoritatea erorilor din procesul total de testare survin în această etapă, problemele putând să apară în orice fază anterioară testării probei [5,7]. Deoarece majoritatea erorilor care se produc în faza preanalitică devin aparente ulterior în cursul fazei analitice sau postanalitice, etapa preanalitică trebuie să aibă mecanisme de control riguroase, pentru a reduce riscul de eroare [7-9].

Recoltarea sângelui este procedura cea mai complexă în faza preanalitică, fiind ca urmare cea mai susceptibilă la erori. Procedura standardizată pentru recoltarea de sânge

este descrisă în recomandările naționale pentru recoltarea de sânge venos și trebuie respectată [10]. În materialul de față vor fi discutate aspectele specific legate de procesele din faza preanalitică pentru testele de coagulare.

Solicitarea testului

Una din problemele principale este reprezentată de lipsa informațiilor pe cerearea de analiză. [6]. Lipsa unor informații cum ar fi diagnosticul prezumtiv, sau tratamentul anticoagulant urmat de pacient pot duce la interpretări eronate a rezultatelor testelor sau la testări inutile sau repetate, grevate de costuri suplimentare. Prin urmare, pe lângă solicitarea propriu zisă a testului, este necesar să se menționeze diagnosticul prezumtiv și tratamentul anticoagulant [10]. Aceste informații sunt absolut necesare pentru a asigura raportarea și interpretarea adecvată a rezultatelor.

Recomandare

Informațiile despre diagnosticul prezumtiv sau cunoscut precum și despre tratamentul anticoagulant urmat de pacient trebuie să facă parte integrantă din solicitarea testelor de coagulare.

Pregătirea și identificarea pacientului

Recomandările generale privind pregătirea pacientului înainte de efectuarea puncției venoase și identificarea adecvată a pacientului în timpul recoltării de sânge sunt descrise în recomandările naționale pentru recoltarea de sânge și sunt aplicabile și pentru testele de coagulare [10].

Recomandare

Pregătirea pacientului înainte de efectuarea puncției venoase și identificarea adecvată a pacientului în timpul recoltării de sânge trebuie să respecte recomandările naționale pentru recoltarea de sânge [10].

Tuburi și anticoagulant

Sângele venos pentru testele de coagulare trebuie recoltat în tuburi de sticlă sau de plastic, care au în interior suprafețe inerte (non activante pentru coagulare). Astfel, tuburile de sticlă trebuie să fie silicate, iar tuburile de plastic să fie din polipropilenă ca material non activator [11,13].

Tuburile trebuie să conțină citrat trisodic ca anticoagulant, având concentrația 105-109 mmol/L, respectiv 3.2%. Deși pe piață există și tuburi conținând citrat trisodic cu concentrația de 129 mmol/L respectiv 3.8%, intervalele de referință și rezultatele testelor pot varia în probele recoltate în tuburi cu concentrație de citrat diferită.

De exemplu, în tuburile cu citrat trisodic 3.8% PT și APTT pot fi supraestimate iar fibrinogenul subestimat,

dacă intervalele de referință au fost stabilite folosind probe recoltate în tuburi cu citrat trisodic 3.2% [11-13].

Prin urmare, recomandarea majoră este ca laboratoarele să utilizeze tuburi cu aceeași concentrație de citrat trisodic, preferabil 3.2% (11). Acest aspect este important deoarece doar citratul trisodic 3.2% este folosit pentru alocarea Indicelui de Sensibilitate Internațional (ISI) pentru tromboplastină de către Scientific and Standardization Committee (SSC) al ISTH, și de către CLSI [11].

Proporția între volumul de sânge și cel de anticoagulant trebuie să fie întotdeauna de 9:1. Este important să se recolteze cantitatea corectă de sânge (de obicei indicată pe tub) pentru a asigura raportul corect între sânge/anticoagulant și rezultate corecte [11]. Deși rezultatele unor studii sugerează că devieri mai mari de la volumul final sunt acceptabile pentru anumite teste, totuși recomandarea generală este să se accepte o abatere +/- 10% de la linia de pe tub, corespunzând cu 90-110% din volumul final [12-14].

Recomandări

1. Probele de sânge venos pentru teste de coagulare trebuie recoltate în tuburi din sticlă sau din plastic având la interior suprafețe non activante.
2. Tuburile trebuie să conțină citrat trisodic tamponat ca anticoagulant, preferabil de concentrația 105-109 mmol/L, respectiv 3.2%.
3. Proporția între volumul de sânge și cel de anticoagulant în tubul de recoltare trebuie să fie întotdeauna 9:1.
4. Se consideră acceptabilă o abatere de +/- 10% de la linia de umplere marcată pe tub.

Recoltarea de sânge

Sângele trebuie recoltat în mod netraumatic dintr-o venă periferică, la distanță de cateterul intravenos (dacă acesta este montat). Toate procedurile legate de puncția venoasă, inclusiv durata de menținere a garoului și agitarea tubului în vederea omogenizării sângelui cu anticoagulantul trebuie să respecte recomandările publicate anterior [8,10,11].

Pentru pacienții la care nu este posibilă puncția venoasă, probele de sânge trebuie recoltate printr-un dispozitiv vascular (cateter venos central sau periferic). Dacă cateterul a fost în prealabil spălat cu heparină, trebuie efectuată procedura următoare: se recomandă spălarea cateterului cu ser fiziologic și îndepărtarea primilor 5 ml de sânge sau a unui volum de sânge echivalent cu de 6 ori spațiul mort al cateterului [11,15].

Când probele sunt recoltate dintr-un cateter venos periferic, cantitatea de sânge îndepărtată anterior recoltării trebuie să fie de 2 ori volumul mort al cateterului și extensiei sale.

În cazul recoltării de sânge dintr-un dispozitiv vascular, această informație trebuie menționată întotdeauna pe formularul de solicitare a testului. În asemenea situații, trebuie avute în vedere o posibilă contaminare cu heparină sau o diluție a probei [11].

Recomandări

1. Recoltarea de sânge trebuie să respecte recomandările naționale pentru recoltarea de sânge venos [10].
2. Înainte de recoltarea de sânge pentru teste de coagulare dintr-un cateter venos, se recomandă spălarea cateterului venos central cu ser fiziologic și îndepărtarea primilor 5 ml de sânge, sau de 6 ori spațiul mort al cateterului. Dacă probele sunt recoltate dintr-un cateter venos periferic, se îndepărtează un volum de sânge echivalent cu de 2 ori spațiul mort al cateterului și extensiei sale.

Ordinea tuburilor la recoltare

Pentru a reduce la minimum contaminarea probelor pentru testele de coagulare, tuburile trebuie recoltate respectând o anumită succesiune, care previne obținerea de rezultate eronate cauzate de vehicularea anumitor aditivi de la un tub la altul (carry-over) sau formarea de microcheaguri în cursul recoltării [10-14]. Tuburile pentru teste de coagulare trebuie recoltate înaintea oricărui alt tub cu aditivi (activatori de coagulare, respectiv trombină) sau alți agenți anticoagulanți (etilendiaminotetraetilacetat EDTA), litu-heparină sau inhibitori ai glicolizei [11,13,14].

Nu este necesar să se recolteze un tub inițial care să fie îndepărtat înainte de recoltarea de sânge pentru teste de coagulare de rutină sau pentru D-dimeri [10,11,14]. O excepție de la această regulă o constituie procedura de recoltare prin intermediul unui fluturaș, când aerul din sistemul de recoltare duce la umplerea incompletă a tubului de recoltare. În acest caz se recoltează inițial un tub fără aditiv, care va fi îndepărtat [11].

Recomandări

1. Tubul pentru teste de coagulare trebuie recoltat înaintea tuburilor cu alți aditivi (activator de coagulare sau cu alt anticoagulant).
2. Nu este necesară recoltarea unui tub inițial care să fie îndepărtat înaintea recoltării pentru teste de coagulare de rutină și D dimeri. Face excepție situația în care se recoltează cu branulă cu fluturaș (care din cauza aerului din sistem duce la umplerea incompletă a tubului), caz în care se recoltează inițial sânge într-un tub fără aditiv, acesta fiind ulterior îndepărtat.

Respingerea probelor

Fiecare laborator trebuie să își stabilească criteriile pentru respingerea probelor neconforme pentru teste de coagulare.

Probele care nu ajung în laborator în intervalul de timp adecvat pentru analiză (vezi secțiunea Păstrarea probelor până la analiză), probele neetichetate sau etichetate greșit, probele coagulate, probele recoltate în tuburi conținând alt anticoagulant, cele la care nu se respectă proporția între sânge și anticoagulant, probele cu hemoliză intensă sau cele care au fost refrigerate înaintea testării trebuie respinse [8,11,16].

Recomandare

Fiecare laborator trebuie să își stabilească criterii bine definite de respingere a probelor neconforme pentru testele de coagulare.

Prelucrarea probelor

Majoritatea testelor screening de coagulare PT, APTT, TT, fibrinogen, D-dimeri se efectuează din plasma obținută din probe pregătite prin centrifugarea unui tub primar la temperatura camerei (18-25 °C), la 1500xg timp de 15 minute [8,11,16]. Deși centrifugarea se poate face pe durată mai scurtă și la turație mai mare, este important de menționat că în aceste condiții se poate produce activarea plachetelor și liza hematiilor [8,11,16].

Pentru a obține probe conforme, trebuie folosite centrifugi cu rotor cu balans, și trebuie evitată folosirea frânării la oprirea centrifugii [16]. Dacă se utilizează centrifugi cu răcire, acestea trebuie setate la temperatura ambiantă, deoarece temperaturile scăzute duc la activarea plachetelor și induc diferite modificări [11]. Pentru probele care trebuie congelate până la testare, se recomandă dubla centrifugare înainte de congelare, pentru a obține plasma săracă în plachete (platelet poor plasma, PPP), care conține $<10 \times 10^9$ plachete/L [16,17]. Eșantioanele de plasmă care se congelează trebuie separate de celule.

Recomandări

1. Probele de plasmă pentru testele screening PT, APTT, TT, fibrinogen și D-dimeri se prepară prin centrifugarea tubului primar la temperatura ambiantă (18-25 °C), la 1500 xg timp de 15 minute.
2. Toate probele de plasmă care trebuie congelate până la testare trebuie să fie centrifugate de două ori înainte de congelare pentru a obține plasma săracă în plachete (platelet poor plasma, PPP), care conține $<10 \times 10^9$ plachete/L.

Probe cu valori mari ale hematocritului

În probele cu valori mari ale hematocritului (Hct), peste 0.55L/L, respectiv 55%, concentrația finală a citratului în tub trebuie ajustată, pentru a menține raportul de 9:1 între sânge și anticoagulant. În probele cu hematocrit mare, cantitatea de citrat este excesivă raportat la volumul de plasmă din tub, ceea ce poate influența rezultatele testelor.

Volumul de citrat care rămâne în tub este calculat aplicând formula [11,18]:

$$C (mL) = 0.185 \times [volumul\ de\ sânge\ (mL)] \times [1.0 - Hct\ (L/L)]$$

unde C reprezintă volumul de citrat în mL care rămâne în tub, 0.185 este o constantă, volumul de sânge depinde de tipul de tub folosit, iar Hct este hematocritul pacientului.

Volumul de citrat care trebuie îndepărtat se calculează scăzând volumul de citrat care rămâne în tub (calculat anterior) din volumul total de citrat din tub. Se recomandă folosirea unei seringi de tuberculinare pentru a îndepărta citratul, pentru a menține vidul în tubul de recoltare. Dacă nu este disponibilă o asemenea seringă, citratul va fi înlăturat cu o pipetă automată, ceea ce implică pierderea vidului din sistemul de recoltare și recoltarea ulterioară a sângelui în sistem deschis. După îndepărtarea dopului și ajustarea cantității de citrat, se recoltează sânge până la semnul de volum final de pe tub. Se închide tubul și se omogenizează sângele cu anticoagulantul. Manevrarea ulterioară a tubului se face conform aceluiași proceduri ca și pentru celelalte probe de coagulare.

Indiferent cum se face îndepărtarea citratului din tub, este responsabilitatea personalului din laborator să informeze persoanele care recoltează despre necesitatea corecției cantității de citrat și desfășurarea corectă a recoltării.

Pe buletinul de rezultate se va menționa că volumul de citrat din tub a fost ajustat, din cauza valorii mari a hematocritului:

“Testele de coagulare s-au efectuat din probă cu volum ajustat de anticoagulant (citrat), din cauza valorii crescute a hematocritului (Hct = xx L/L)”

unde xx reprezintă valoarea exactă a hematocritului.

Dacă nu este posibil să se obțină o nouă probă pentru a se ajusta volumul de citrat, rezultatul va fi însoțit de următorul comentariu:

“Nu este posibilă ajustarea volumului de citrat în funcție de valoarea crescută a hematocritului (Hct = xx L/L). Raportul modificat între sânge și anticoagulant poate influența rezultatele testelor. Se recomandă repetarea recoltării după o înțelegere prealabilă cu personalul din laborator”.

Recomandări

1. Concentrația finală de citrat în tub trebuie ajustată pentru a menține raportul de 9:1 între volumul de sânge și cel de anticoagulant în probele de sânge la care hematocritul este peste 0.55 L/L.
2. Pe buletinul cu rezultate se va menționa că volumul de citrat a fost ajustat din cauza valorilor crescute ale hematocritului: "Testele de coagulare s-au efectuat din probă cu volum ajustat de anticoagulant (citrat), din cauza valorii crescute a hematocritului (Hct = xx L/L).", unde xx reprezintă valoarea exactă a hematocritului.

Hemoliza, hiperbilirubinemia și lipemia

Hemoliza, hiperbilirubinemia și lipemia pot influența rezultatele testelor de coagulare [19]. Prezența lor poate fi detectată prin inspecție vizuală sau automat. Interferențele analitice se pot produce în principal prin suprapunerea spectrală a substanțelor interferente (hemoglobină, bilirubină, particule lipidice). Noile generații de analizoare de coagulare măsoară absorbanta optică la diferite lungimi de undă, ca index de de hemoliză, icter și lipemie (HIL index), permițând identificarea probelor potențial problematice înainte de efectuarea testelor, iar impactul substanțelor interferente în timpul testării va fi redus prin autoselectarea unor lungimi adecvate de undă [19,20]. Dacă nu există posibilitatea determinării automate a HIL, concentrația acceptabilă a substanțelor interferente trebuie estimată prin inspecție vizuală.

În afară de interferența spectrofotometrică, probele hemolizate pot pune probleme din cauza eliberării în tub a componentelor celulare, având drept efect activarea prematură a coagulării și influențarea detecției cheagului [19]. Ca urmare, în aceste situații se impune solicitarea unei noi recoltări, cu o probă nehemolizată [11]. În afară de hemoliza in vitro, este posibil să fie vorba și de o hemoliză intravasculară, in vivo. Prezența acesteia trebuie exclusă prin comunicare cu personalul clinic înainte de a solicita repetarea recoltării. În aceste cazuri, rezultatul testelor va fi însoțit de menționarea hemolizei intravasculare.

Hiperbilirubinemia produce o interferență optică nesemnificativă, care poate fi prevenită prin citirea la alte lungimi de undă, rezultatele testelor putând fi raportate [19].

În mod similar, citirea la lungimi diferite de undă și/sau diluarea suplimentară a probei la teste cu prediluție (cum ar fi fibrinogenul) pot preveni interferențele optice legate de lipemie [19]. Pentru a înlătura influența lipemiei, unele laboratoare recurg la ultracentrifugare; cu toate acestea, nu există date publicate despre validarea acestei proceduri [16].

Utilizarea metodelor mecanice și/sau electromecanice de detecție a cheagului este recomandată în toate cazurile de probe cu substanțe care interferă cu transmiterea luminoasă. Chiar în cazul utilizării acestor metode, interferențele biologice pot influența testele de coagulare. De exemplu hiperlipemia severă poate influența rezultatele testelor de coagulare, prin dislocuirea plasmei, ceea ce va avea ca rezultat prelungirea timpilor de coagulare.

Recomandări

1. Pentru testele screening de coagulare, laboratoarele trebuie să își stabilească concentrația de substanțe interferente acceptabilă pentru propriu sistem echipament/ reactiv.
2. Dacă se suspectează prezența unei hemolize intravasculare (in vivo), aceasta va fi menționată alături de raportarea rezultatului
3. Utilizarea metodelor mecanice și/sau electromecanice de detecție a cheagului este recomandată în toate cazurile de probe cu substanțe care interferă cu transmiterea luminoasă.

Păstrarea probelor până la testare

În condiții ideale, efectuarea testelor de coagulare ar trebui făcută în decurs de 4 ore de la recoltare. Conform studiilor recente excepția de la această regulă se aplică la PT și D Dimeri, pentru care probele se pot păstra la temperatura camerei până la 24 de ore de la recoltare, fie centrifugate, fie necentrifugate, fără separarea plasmei, în tuburi închise [11,12,20].

Cu toate acestea, întrucât stabilitatea probei poate fi dependentă de sistemul de lucru (tromboplastină/coagulometru), laboratoarele care acceptă testarea PT și a D dimerilor după 24 de ore de la recoltare trebuie să verifice stabilitatea probei cu propriul lor sistem [21].

Probele pentru toate testele de hemostază se păstrează în tuburi închise, la temperatura camerei (18-25 °C). Păstrarea la frigider (2-8 °C) nu este recomandată din cauza activării la rece a factorului VII (FVII) al coagulării și pierderii activității factorului VIII (FVIII), având impact asupra rezultatelor PT și APTT [16,20,22].

Dacă APTT se solicită pentru monitorizarea tratamentului cu heparină nefracționată, probele trebuie centrifugate și plasma trebuie separată în decurs de o oră de la recoltare, deoarece heparina poate fi neutralizată de către factorul plachetar 4 (PF4) eliberat de plachete [11,16,21].

Dacă efectuarea testelor de hemostază nu e posibilă în intervalul recomandat, plasma trebuie separată de celule după centrifugare și congelată imediat la -20 °C pentru stocarea pe termen scurt (până la 2 săptămâni) sau la -70 °C până la 6 luni. Dacă se preconizează că din probă vor fi necesare mai multe teste, trebuie stocat și congelat câte un eșantion separat pentru fiecare test [16,20].

Recomandări

1. Probele pentru toate testele de hemostază se păstrează în tuburi închise, la temperatura camerei (18-25 °C) până la testare.
2. Testarea pentru toate testele de coagulare trebuie făcută în 4 ore de la recoltare. Excepția de la această regulă se aplică la PT și D Dimeri, pentru care probele se pot păstra la temperatura camerei până la 24 de ore de la recoltare, fie centrifugate fie necentrifugate, fără separarea plasmei, în tuburi închise.
3. Laboratoarele care acceptă pentru testarea PT și a D dimerilor probe stocate pentru 24 de ore trebuie să verifice stabilitatea acestora pentru sistemul propriu.
4. Dacă APTT se solicită pentru monitorizarea tratamentului cu heparină nefracționată, probele trebuie centrifugate și plasma trebuie separată în decurs de o oră de la recoltare.
5. Dacă efectuarea testelor de hemostază nu e posibilă în intervalul recomandat, plasma trebuie separată de celule după centrifugare și congelată imediat la -20 °C pentru stocarea pe termen scurt (până la 2 săptămâni) sau la -70 °C până la 6 luni.

Transportul probelor la distanță

Probele trebuie să ajungă la laborator în intervalul de timp recomandat pentru fiecare test [16,20]. Dacă nu este posibil, probele trebuie centrifugate de 2 ori, și eșantioanele de plasma se transferă în tuburi de polipropilenă. Fiecare tub se etichetează cu numele complet al pacientului, data nașterii, un număr de identificare (numărul asigurării, numărul de identificare unic din laborator). Se menționează de asemenea tipul de probă (plasma citratată), data și ora recoltării. Eșantioanele de plasmă se congeleză imediat, conform procedurii descrise anterior.

Probele congelate de plasmă se transportă de preferat pe gheață uscată, sau dacă nu este posibil, pe gheață în containere de polistiren, astfel încât probele să rămână complet congelate până la ajungerea în laborator. Testarea nu se va efectua din probele care nu sunt complet congelate la sosirea în laborator [5,8,11].

Recomandări

1. Probele trebuie să ajungă la laborator în intervalul de timp recomandat. Altfel, plasmale trebuie congelate conform procedurii descrise mai sus.
2. Tuburile trimise la distanță trebuie etichetate cu numele complet al pacientului, data nașterii și un număr de identificare. Se va menționa și tipul de probă (plasma citratată), data și ora recoltării.
3. Plasmale congelate se transportă pe gheață (preferabil uscată) în containere de polistiren, pentru a rămâne complet congelate până la ajungerea în laborator.

Decongelarea probelor congelate

Decongelarea probelor congelate trebuie să fie rapidă, timp de 10 minute la 37 °C în termostat, dry-thermo block sau în baie de apă [5,16,20]. Anterior testării, după decongelare, proba trebuie agitată pentru a fi omogenizată [23]. Procedura optimă constă în răsturnarea blândă a tubului la 180° și revenirea la poziția inițială de 6 ori [23]. Cu toate acestea, dacă proba nu este complet decongelată sau dacă este menținută prea mult timp la 37 °C, activitatea factorilor coagulării se modifică, ceea ce conduce la obținerea de rezultate eronate [5,20,24]. Dacă se folosește baia de apă pentru decongelare, trebuie o atenție sporită pentru a nu se compromite datele de identificare a pacientului înscrise pe etichetă.

Recomandări

1. Decongelarea probelor congelate trebuie să fie rapidă, timp de 10 minute la 37 °C în termostat, dry-thermo block sau în baie de apă.
2. Anterior testării, după decongelare, proba trebuie agitată pentru a fi omogenizată [23] prin răsturnarea blândă a tubului la 180° și revenirea la poziția inițială de 6 ori.

ETAPA ANALITICĂ ÎN TESTAREA HEMOSTAZEI

Controlul de calitate

Scopul controlului de calitate este acela de a asigura furnizarea de rezultate fiabile.

Atât controlul intern cât și schemele de control extern trebuie să constituie părți fundamentale din procesul de asigurare a calității în laboratoarele care efectuează teste de coagulare.

Controlul intern de calitate asigură evaluarea continuă a rezultatelor și reduce variația întâmplătoare în cursul aceleiași zile sau între zile, în timp ce obiectivul major al controlului extern este să asigure comparabilitatea datelor între laboratoare, respectiv exactitatea măsurării [27,28].

Controlul intern trebuie făcut întotdeauna după deschiderea sau/și reconstituirea reactivilor, calibrare, după procedurile periodice de întreținere/service sau după depanarea defecțiunilor echipamentului [27]. Pentru testele cantitative, controlul trebuie să includă minim două nivele (normal și patologic) care trebuie rulate la fiecare 8 ore în cazul operării continue [29]. Se admit scheme diferite de control intern în cazul în care laboratorul și-a analizat procesul de lucru și a analizat riscul.

În ceea ce privește controlul extern, nu există studii bazate pe dovezi privind frecvența optimă cu care trebuie făcut, dar el trebuie să fie o parte esențială din sistemul de management al calității din laborator [2].

Recomandări

1. Controlul intern se efectuează întotdeauna după deschiderea sau/și reconstituirea reactivilor, calibrare, după procedurile periodice de întreținere/service sau după depanarea defectăunilor echipamentului.
2. Pentru testele cantitative, controlul trebuie să includă minimum două niveluri (normal și patologic) care trebuie rulate la fiecare 8 ore în cazul operării continue. Se admit scheme diferite de control intern în cazul în care laboratorul și-a analizat procesul de lucru și a analizat riscul.
3. Controlul extern trebuie să fie o parte esențială din sistemul de management al calității din laborator.

Testele de coagulare

Pentru a raporta rezultate corecte și fiabile la testele de coagulare, este esențial ca laboratorul să selecteze o metodă adecvată de testare. Numeroasele teste disponibile pe piață pot fi împărțite în trei categorii principale: teste coagulometrice, teste cromogene și teste imunologice. Informații specifice legate de principiile testelor, echipamentul și tehnicile utilizate în laboratoarele de hemostază sunt descrise de Mackie et al. și nu constituie o parte a recomandărilor de față [25].

Pentru implementarea coagulometrelor în practica de rutină, evaluarea și validarea trebuie făcute conform recomandărilor publicate de Gardiner et al. [26].

La alegerea unei metode pentru teste de coagulare, este importantă cunoașterea caracteristicilor lor analitice, prin urmare, cele mai importante caracteristici analitice pentru PT, APTT, TT, fibrinogen D-dimeri vor fi prezentate mai jos [4].

Recomandare

Pentru implementarea coagulometrelor în practica de rutină, evaluarea și validarea trebuie făcute conform recomandărilor publicate [26].

Timpul de protrombină (PT)

PT este cel mai frecvent solicitat dintre testele de coagulare, fiind utilizat pentru monitorizarea tratamentului cu antagoniști ai vitaminei K (AVK) și pentru a evalua deficiențele genetice și dobândite ale factorilor II (FII), V (FV), VII (FVII), X (FX), fibrinogen, respectiv prezența inhibitorilor acestora [29].

Toți reactivii comerciali pentru PT cunoscuți sub denumirea de tromboplastină conțin factor tisular, fosfolipide și clorură de calciu. Pe piață există diferite tromboplastine comerciale de proveniență umană, animală sau recombinante.

Rezultatele PT depind de tipul de reactiv și de echipamentul folosit, astfel că rezultatul PT va fi variabil de la un laborator la altul [4]. Pentru a standardiza PT și a permite monitorizarea tratamentului cu AVK în laboratoare diferite, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a introdus raportarea rezultatelor PT sub formă de INR [29-31]. Pentru fiecare lot de reactivi pentru PT, producătorii trebuie să determine și să atribuie o valoare specifică a ISI, care indică sensibilitatea reactivului la nivelele factorilor dependenți de vitamina K prin comparare cu standardul de referință al OMS, International Reference Preparation (IRP).

INR (International Normalized Ratio) este o valoare calculată, reprezentând raportul între PT al pacientului exprimat în secunde, împărțit la Mean Normal Prothrombin Time (MNPT), ridicat la puterea ISI a reactivului folosit [31,32]. MNPT reprezintă media geometrică a valorilor PT obținute de la minimum 20 de voluntari sănătoși. Formula pentru calcularea INR este următoarea:

$$INR = (PR)^{ISI} \text{ sau } INR = [PT(s) / MNPT(s)]^{ISI}$$

unde PT(s) este PT al pacientului exprimat în secunde, PR este raportul timpului de protrombină, MNPT este media geometrică a timpilor normali de protrombină, iar ISI este International Sensitivity Index.

Deși pe piață există tromboplastine cu ISI până la 1.5 sau chiar 1.7, este recomandat să se utilizeze tromboplastine recombinante cu valori mai joase ale ISI, sub 1.2, din cauza sensibilității lor mai mari la deficiențele de factori, precum și a preciziei crescute la determinarea INR [29-33].

Independent de cele de mai sus, un INR determinat din aceeași probă de plasmă cu diferite tromboplastine nu va avea întotdeauna aceeași valoare, întrucât variațiile pot fi generate și de determinarea incorectă a MNPT sau de valoarea ISI aplicată de laborator [31].

Oricând este posibil, se recomandă determinarea valorii specifice a ISI pentru combinația locală tromboplastină/coagulometru, deoarece oferă o acuratețe mai bună pentru INR față de aplicarea unui ISI generic (un ISI care nu este specific pentru un anumit coagulometru ci pentru un grup/tip de coagulometre). Când valoarea ISI pentru o combinație specifică tromboplastină/coagulometru nu este disponibilă, se recomandă să fie determinată local [29,30,32]. Aceasta se poate realiza prin utilizarea unui set de probe de plasmă liofilizată certificată pentru PT obținut prin folosirea IRP. Plasma se testează utilizând combinația specifică analizor/ reactiv, iar valorile PT obținute se raportează la valorile certificate. Panta care are cea mai bună regresie ortogonală se utilizează pentru calcularea ISI local, conform ecuației: $ISI (local) = panta \times ISI (IRP)$.

Determinarea unei valori specifice a INR fără cunoașterea MNPT sau a ISI este posibilă printr-o metodă directă, dacă sunt disponibile plasmă liofilizate cu val-

ori atribuite ale INR. Plasma de calibrare este testată pe combinația specifică coagulometru/reactiv și timpii obținuți se raportează la valorile certificate ale INR. Această metodă crește acuratețea determinării INR și permite o mai bună comparabilitate interlaboratoare a rezultatelor (detalii suplimentare în referințele 29, 30, 32).

Recomandări

1. Pentru determinarea PT se recomandă utilizarea tromboplastinelor recombinante cu valori ISI sub 1.2.
2. Se recomandă utilizarea unui ISI specific pentru combinația coagulometru/reactiv de câte ori este posibil. În cazul în care ISI specific nu este disponibil, se recomandă determinarea ISI local.

Timpul de tromboplastină parțială activată (APTT)

APTT este un test screening utilizat pentru evaluarea deficitelor de FVIII, FIX, FXI și FXII sau pentru detectarea prezenței inhibitorilor acestora.

Reactivul APTT conține un activator al factorilor de contact (silica, caolin, acid elagic, sau o combinație de activatori) și fosfolipide cu origine diferită. Întrucât nu conține factor tisular (FT), este denumit "tromboplastină parțială". Factorii din proba de plasmă sunt "activați" după adăugarea reactivului APTT și a clorurii de calciu (ca reactiv separat) la 37 °C [29,34].

APTT se determină în secunde, rezultatele fiind dependente de reactivul și de analizorul utilizat. Datorită compoziției variabile (fosfolipide și activatori), reactivii APTT diferă substanțial în privința sensibilității lor la factorii coagulării, heparine nefracționate și prezența anticoagulantului lupic (LA).

Pentru efectuarea APTT ca test screening se recomandă folosirea unui reactiv sensibil la deficitul de factori și la heparine nefracționate, dar insensibil la lupus anticoagulant LA [4,29,34].

Cu toate acestea, monitorizarea tratamentului cu heparine nefracționate este dificil de standardizat între diferite laboratoare [35].

Recomandarea generală este ca laboratoarele să își stabilească intervalul terapeutic pentru monitorizarea tratamentului cu heparine nefracționate, ca activitate anti Xa, corespunzând cu un interval de 0.3-0.7 anti-Xa kIU/L. La pacienții tratați cu perfuzie continuă cu heparină, sângele trebuie recoltat la 4-6 ore de la administrarea bolusului de heparină, dar la mai puțin de 24 de ore după administrarea primei doze de antivitamine K.

Probele trebuie prelucrate conform procedurii standard, preferabil centrifugate de 2 ori, iar plasma congelată la -35 °C sau temperaturi și mai scăzute până la efectuarea testului. Plasma se decongelează la 37 °C timp de 10 minute, iar APTT și heparinemia sunt determinate cu un test

anti Xa. Relația între APTT pe axa X și nivelul de heparină pe axa Y se obține prin analiză de regresie lineară [35-37].

Spre deosebire de heparinele nefracționate, heparinele cu greutate moleculară joasă nu necesită monitorizarea de rutină în laborator. Aceasta este necesară totuși la anumite categorii de pacienți: pacienți cu insuficiență renală, obezi, copii, gravide, sau la pacienții la care nu se obține efectul anticoagulant așteptat.

Deoarece heparinele cu greutate moleculară joasă acționează predominant prin activitatea antiXa și nu exercită un impact semnificativ asupra APTT, acest test nu este recomandat pentru monitorizarea lor. Pentru a estima răspunsul terapeutic la heparine cu masă moleculară joasă, se va utiliza exclusiv activitatea antiXa [38].

Recomandări

1. Pentru efectuarea APTT ca test screening, se recomandă folosirea reactivilor APTT sensibili la deficitul de factori și la heparine nefracționate, dar insensibili la anticoagulantul lupic.
2. APTT este un test adecvat pentru monitorizarea tratamentului cu heparine nefracționate.
3. Dacă APTT se folosește pentru monitorizarea tratamentului cu heparine nefracționate, se recomandă laboratoarelor să testeze sensibilitatea reactivului APTT pentru a putea stabili intervalul terapeutic.
4. APTT nu se folosește pentru monitorizarea tratamentului cu heparine cu masă moleculară joasă. Pentru aceasta, se folosește exclusiv activitatea anti-Xa.

Timpul de trombină TT

TT este un test de screening utilizat pentru evaluarea deficitului cantitativ sau a deficitelor calitative ale fibrinogenului, sau pentru a evidenția prezența inhibitorilor trombinei [39,40].

Testul evaluează capacitatea fibrinogenului de a fi transformat în fibrină după adăugarea de trombină bovină sau umană în exces la plasma săracă în plachete (PPP). TT se măsoară în secunde.

Timpul este sensibil la prezența inhibitorilor terapeutici ai trombinei (heparină, dabigatran) și poate detecta contaminarea accidentală cu heparină de pe catetere, chiar la concentrații foarte joase (>0.05 anti-Xa kIU/L). Cu toate acestea, datorită sensibilității la inhibitori ai trombinei (heparină, dabigatran), testul nu este adecvat pentru monitorizarea tratamentului cu aceste două substanțe, nefiind standardizat pentru acest scop [40].

Recomandare

Timpul de trombină nu trebuie utilizat pentru monitorizarea terapiei anticoagulante cu heparină sau alți inhibitori ai trombinei, deoarece este sensibil la aceștia și nu este standardizat pentru acest scop.

Fibrinogenul

În general, fibrinogenul se dozează împreună cu PT și APTT ca parte din screeningul uzual al hemostazei [41,42]. Există multiple metode de dozare a fibrinogenului, cea mai larg răspândită fiind metoda Clauss, prin care se măsoară activitatea funcțională a fibrinogenului [42].

Principiul metodei Clauss constă în adăugarea unui reactiv conținând trombină în concentrație mare la plasma diluată și înregistrarea timpului de coagulare în secunde. Rezultatul se exprimă în g/L și necesită plasmă de calibrare de referință, cu nivele cunoscute de fibrinogen, calibrată față de un standard internațional. Valorile atribuite și obținute se reprezintă grafic pentru a obține o curbă de calibrare care acoperă un interval mare de valori ale fibrinogenului [42,43]. Deși efectul combinației reactiv/analizor are un impact minim asupra testului Clauss, unele studii demonstrează că pot apărea diferențe în cadrul unor subgrupuri (de exemplu la pacienți cu coagulare intravasculară diseminată CID, la cei cu terapie trombolitică), datorate concentrației trombinei și soluției tampon din reactiv [42].

Testul funcțional pentru fibrinogen este considerat cel mai fiabil pentru utilizare largă în laboratoare [42].

Testele imunologice, cum ar fi testele imunoenzimatice (ELISA) sau imunonefelometrice măsoară concentrația fibrinogenului ca antigen, nu ca activitate funcțională [5]. Aceste teste sunt folosite în special pentru investigarea disfibrinogenemiilor, în care apare o discordanță între activitatea funcțională a fibrinogenului și măsurarea lui cantitativă ca antigen. În practică, aceste teste sunt folosite doar în laboratoare specializate [42].

Metoda de dozare a fibrinogenului PT derivat permite o estimare indirectă a fibrinogenului pe baza curbei de coagulare pentru PT la coagulometre optice.

PT este determinat prin modificarea densității optice pentru o serie de diluții ale plasmei, având fiecare concentrații cunoscute de fibrinogen. Densitatea optică pentru fiecare concentrație de fibrinogen este reprezentată sub forma unei curbe de calibrare. Cu toate acestea, literatura de specialitate evidențiază controverse privind adecvarea acestei metode pentru uzul clinic [44,45]. Astfel, deși metoda este simplă și necostisitoare, testul poate furniza rezultate înșelătoare în anumite patologii și nu este recomandat în practica clinică de rutină [42].

Recomandări

1. Testul funcțional pentru fibrinogen este metoda cea mai fiabilă, fiind recomandat pentru utilizarea de rutină în laboratorul clinic.
2. Testele imunologice care măsoară concentrația fibrinogenului ca antigen sunt recomandate în pentru investigarea disfibrinogenemiilor.
3. Metoda de dozare ca fibrinogen PT derivat nu este recomandată pentru practica de rutină în laborator.

D-dimerii

Pentru dozarea D-dimerilor sunt disponibile mai multe metode calitative (pozitive sau negative), semicantitative sau cantitative, cum ar fi ELISA; latex imunoassay (LIA), care folosesc anticorpi monoclonali specifici pentru diverși epitopi ai D-dimerilor [46, 47]. Principala problemă legată de testarea D-dimerilor este faptul că diferitele teste nu sunt standardizate, datorită variabilității anticorpilor monoclonali și calibratorilor utilizați [46-49].

Întrucât la ora actuală nu există un material de referință (standard internațional), unitățile de măsură nu sunt standardizate, ceea ce înseamnă că rezultatele, intervalele de referință și valoarea clinică a cut-off nu pot fi extrapolate între metode. Astfel, rezultatele pentru D-dimeri trebuie interpretate ținând cont de metoda utilizată [48-50]. Pe buletinul de eliberare a rezultatelor trebuie menționată și metoda folosită (de exemplu ELFA).

Recomandări

1. Rezultatele, intervalele de referință și valoarea clinică de cut-off pentru D-dimeri trebuie interpretate ținând cont de metoda utilizată.
2. Metoda de dozare pentru D-dimeri trebuie menționată în buletinul de rezultate.

ETAPA POSTANALITICĂ ÎN TESTAREA HEMOSTAZEI

Intervalele de referință, valorile cut-off și raportarea armonizată a rezultatelor

Rezultatele majorității testelor de coagulare sunt puternic influențate de combinația reactivi/ analizor utilizată. Astfel, dacă pacientul este investigat în mai multe laboratoare, comparabilitatea rezultatelor este dificilă.

Conform datelor din literatură, recomandarea generală pentru fiecare laborator este să își determine propriile intervale de referință pentru populația locală. Având în vedere că acest deziderat poate fi dificil de pus în practică, laboratoarele folosesc intervalele de referință furnizate de producători, sau pe cele din literatură [25,51-53]. Stabilirea propriilor intervale de referință este în principal aplicată atunci când se introduce o nouă metodă, pentru care nu sunt disponibile date din literatură. Dacă intervalele de referință sunt preluate de la producători sau din literatură, datele despre populație și despre metoda de determinare (aplicabilitate la populația locală) trebuie verificate.

Pentru a verifica dacă datele sunt aplicabile pentru populația locală, trebuie selectat un eșantion constând din 20-40 subiecți sănătoși, repartizați uniform în intervalul de referință din literatură. Dacă 95% din rezultate

se încadrează în intervalul de referință, acesta se poate accepta pentru utilizare.

Cu toate acestea, o validare statistică completă ar necesita un eșantion de 120 sau mai mulți subiecți [25,53]. Pentru unii analiți, cum ar fi D dimerii, este mai potrivit să se stabilească valoarea cut-off în funcție de criteriul utilității clinice [25,48].

Utilizarea intervalelor ajustate în funcție de vârstă este esențială pentru a asigura managementul adecvat al copiilor cu tromboze sau cu perturbări hemoragice, dar nu există date în literatură pe grupe de vârstă pentru majoritatea reactivilor folosiți în practică.

Recomandarea generală a SS a ICTH pentru fiecare laborator care raportează rezultate pediatrice este să își stabilească propriile intervale de referință pe grupe de vârstă pentru reactivii și analizoarele pe care le utilizează [54]. Laboratoarele care nu își pot stabili propriile intervale de referință pe grupe de vârstă trebuie să utilizeze și să verifice intervalele publicate pe grupe de vârstă, dacă acestea sunt disponibile.

Recomandări

1. Dacă intervalele de referință sunt preluate din literatură sau de la producători, se recomandă verificarea ca aceste intervale să fie adecvate pentru populația locală.
2. Folosirea intervalelor adaptate pe grupe de vârstă este esențială pentru a asigura managementul adecvat al copiilor cu tromboze sau cu perturbări hemoragice.

Raportarea rezultatelor pentru teste screening de coagulare și pentru D dimeri

Raportarea rezultatelor pentru PT/INR

Pentru raportarea corectă a rezultatelor sunt necesare informațiile despre pacient (diagnosticul prezumtiv și/sau tratamentul). Înțelegerea relevanței raportării rezultatelor în diferite situații clinice determină un mai bun management al pacienților.

PT este măsurat în secunde, pe când coagulabilitatea plasmei este exprimată ca "activitate procentuală din valoarea normală". La o persoană adultă care nu primește tratament cu AVK, valoarea "normală" a PT este >70%. O valoare mai mică de 70% indică faptul că timpul de coagulare este mai lung decât normalul și sugerează hipocoagulabilitatea sângelui [29,51].

În ceea ce privește monitorizarea tratamentului cu AVK, ar trebui ca rezultatele să fie exprimate exclusiv ca INR, în timp ce în toate celelalte situații INR nu ar trebui raportat [30]. Raportarea rezultatelor ca PT-ratio nu poate fi utilizată pentru ajustarea dozelor la pacienții tratați cu AVK, deoarece ea este aplicabilă la un tip particular de tromboplastină. Totuși, unii autori consideră

că, în anumite situații cum ar fi afecțiunile hepatice cronice sau CID, raportarea rezultatelor ca PT-ratio este informativă [33,55].

În general, valori ale INR între 2.0 și 3.0 sunt recomandate ca interval terapeutic pentru majoritatea indicațiilor clinice, deși, pentru pacienții cu proteze valvulare mecanice, INR ar putea fi ușor mai mare (2.0-3.5) [30,33]. Valorile INR peste intervalul terapeutic recomandat indică un risc crescut de sângerare, în timp ce valori sub intervalul terapeutic sunt asociate cu un risc crescut de tromboză.

Este important de subliniat că INR trebuie raportat ca o valoare numerică până la o anumită limită, dependentă de curba de calibrare obținută pentru un lot specific de reactivi.

Fără să fie perfectă în termeni de comparabilitate a rezultatelor interlaboratoare, exprimarea ca INR reduce variabilitatea și furnizează rezultate utile pentru clinicieni [29,30].

Recomandări

1. Rezultatele pentru PT trebuie raportate procentual dacă pacientul nu urmează tratament cu AVK.
2. INR nu se raportează la pacienții care nu primesc AVK.
3. Sistemul de raportare ca INR trebuie folosit exclusiv pentru monitorizarea tratamentului cu AVK.

Raportarea rezultatelor APTT

APTT este măsurat și raportat în secunde. Interpretarea corectă a rezultatelor APTT necesită înțelegerea contextului clinic al indicării testului, precum și limitele testului [29,34]. Deoarece reactivii pentru APTT diferă considerabil în ceea ce privește sensibilitatea față de deficitele factorilor coagulării, față de heparine nefracționate sau față de lupus anticoagulant LA, [29,34-37], raportarea APTT doar ca secunde poate conduce la o comparabilitate inadecvată a rezultatelor între laboratoare, având în vedere că atât intervalele de referință cât și rezultatele testului variază în funcție de reactivi și de coagulometru. Prin urmare, APTT ar trebui să fie raportat atât în secunde cât și ca raport (ratio).

APTT ratio reprezintă raportul între valoarea APTT a pacientului și valoarea medie a intervalului de referință pentru sistem particular (reactivi/coagulometru) folosit [51]. Considerând intervalul de referință pentru APTT în secunde, acesta poate fi furnizat de producător sau preluat din literatură, dar aplicabilitatea lui la populația locală trebuie verificată. Intervalul de referință exprimat ca APTT ratio este în general 0.8-1.2, independent de sistemul în uz.

Recomandare

Rezultatul APTT trebuie raportat atât în secunde cât și ca raport (ratio).

Raportarea rezultatelor pentru timpul de trombină

Timpul de trombină de sine stătător are o valoare diagnostică redusă și trebuie interpretat în contextul testelor de coagulare de primă linie: PT, APTT și fibrinogen. Timpul de trombină este măsurat și raportat în secunde.

Intervalele de referință nu sunt armonizate până la ora actuală și depind în mare măsură de combinația reactiv (respectiv concentrația de trombină din reactivul folosit) /coagulometru [39,40]. Ca și pentru APTT, intervalul de referință poate fi preluat de la producător sau din literatură, dar trebuie efectuată verificarea.

Recomandare

Rezultatele TT trebuie raportat în secunde.

Raportarea rezultatelor pentru fibrinogen

Rezultatele pentru fibrinogen sunt exprimate ca g/L. La adulții sănătoși, intervalul de referință este în general 1.8-4.0 g/L dar poate fi diferit pentru diferite tipuri de teste comerciale [42].

Un sondaj în laboratoarele din Croația indică folosirea intervalelor de referință corespunzător cu documentele publicate de CCMB în 2005, dar acestea fiind bazate pe rezultate obținute din tuburi cu citrat 3.8% trebuie revizuite [6,33]. Intervalele de referință pentru fibrinogen pot fi preluate de la producători sau din literatură, dar trebuie efectuată verificare.

Recomandare

Rezultatele pentru fibrinogen trebuie exprimate în g/L.

Raportarea rezultatelor pentru D-dimeri

Metodele pentru dozarea D-dimerilor utilizează anticorpi cu specificitate diferită, unități de măsură diferite și valori cut-off diferite. Prin urmare, nu este posibilă compararea rezultatelor obținute prin metode diferite [46-50].

În general, rezultatele pentru D-dimeri exprimate ca unități echivalente de fibrinogen (fibrinogen-equivalent units (FEU)) sunt aproximativ de două ori mai mari decât cele exprimate ca unități D-dimeri (D-dimer units (DDU)). De exemplu 1.0 mg/L FEU este aproximativ echivalent cu 0.5mg/L DDU. La ora actuală nu există un consens privind modul preferabil de raportare.

O altă problemă întâlnită în practică este faptul că prospectele anumitor reactivi nu menționează informații despre tipul de unități (FEU sau DDU) folosite în test. Ca urmare, nu este recomandată utilizarea acestor kituri.

Există și o variabilitate a raportării rezultatelor pentru D-dimeri legată de unitățile de măsură (mg/L sau µg/L), ceea ce poate deruta clinicienii [46,48].

Întrucât rezultatele diferitelor metode pentru D-dimeri nu pot fi comparate, laboratoarele trebuie să

menționeze pe buletinul de rezultate metoda utilizată și unitățile de măsură pentru DDU, respectiv FEU. Unitățile de măsură folosite ar trebui să fie mg/L FEU sau DDU.

Recomandarea generală pentru laboratoare este ca acestea să își determine propria valoare cut-off pentru metoda în uz de dozare a D-dimerilor [48]. Această cerință fiind dificil de realizat, valorile cut-off se bazează în primul rând pe valorile furnizate de producători. Se recomandă ca aceste valori să fie validate clinic.

Trebuie subliniat că valorile cut-off pentru D-dimeri reflectă valoarea predictivă negativă a testului, utilitatea lui majoră fiind absența valorilor ridicate.

Recomandări

1. Rezultatele pentru D-dimeri trebuie raportate în mg/L DDU sau FEU.

2. Metoda de dozare a D dimerilor trebuie menționată pe buletinul de analize împreună cu rezultatele testului.

3. Trebuie evitată utilizarea kiturilor care nu furnizează informații despre tipul de unități folosite (DDU/ FEU).

Comentarii interpretative

Un sondaj făcut în laboratoarele din Croația arată că un număr mic de laboratoare interpretează rezultatele testelor de coagulare, sau fac recomandări pentru testări ulterioare [6]. La ora actuală, laboratoarele sunt încurajate să furnizeze comentarii interpretative/informative legate de interferențele sau constatările laboratorului privind proba pacientului [56].

Comentariile interpretative/informative atașate rezultatelor pot ajuta clinicianul să folosească adecvat informațiile oferite de laborator. Astfel, pentru a preveni și a reduce erorile și a îmbunătăți evoluția pacienților, se recomandă adăugarea de comentarii interpretative adecvate, legate atât de faza preanalitică cât și de cea analitică a procesului de testare, precum și recomandări pentru testări suplimentare, acolo unde se impune.

Armonizarea comentariilor interpretative depășește cadrul acestui ghid.

Recomandare

Se recomandă adăugarea de comentarii interpretative adecvate, legate atât de faza preanalitică cât și de cea analitică a procesului de testare, precum și recomandări pentru testări suplimentare, acolo unde se impune.

Raportarea valorilor critice

Rezultatele critice sunt acele valori care (prin comparare cu valorile normale/așteptate sau cu cele precedente ale pacientului) indică o condiție fiziopatologică ce periclitează

viața pacientului și impune luarea unor măsuri urgente. Pentru hemostază, acestea pot fi sugestive pentru un risc iminent de sângerare sau de tromboză [57].

În general, valorile critice pentru PT, APTT și fibrinogen sunt variabile pe plan mondial și nu sunt standardizate la ora actuală. În practica clinică, o valoare a INR >5.0 este considerată clinic relevantă și necesită intervenție promptă pentru a reduce efectul anticoagulant al AVK (reducerea dozei acestuia) și de a preveni riscul de sângerare (de exemplu administrarea de vitamina K, plasma proaspătă congelată sau complex protrombolic) [58,59].

La stabilirea valorilor critice pentru APTT, laboratoarele trebuie să ia în considerare rezultatele APTT specific pentru combinația reactiv/analizor cu care lucrează, conform procedurii descrise anterior [59]. În general, intervalul terapeutic pentru APTT ratio trebuie să fie de 1.5-2.5 ori mai mare decât limita superioară a intervalului de referință. Valori mai mari ale APTT ratio sugerează risc de sângerare și impun luarea de măsuri (ajustarea dozei de heparină) [57].

Deoarece nu există un consens privind valoare critică, aceasta trebuie stabilită de comun acord cu clinicienii.

Valori ale fibrinogenului mai mici de 0.8g/L indică un risc ridicat de sângerare și trebuie raportate imediat clinicianului [57,59]. În absența unor ghiduri universal acceptate, laboratoarele sunt încurajate să își definească propriile limite de valori critice relevante și/sau să își extindă lista existentă de valori critice în concordanță cu opinia clinicienilor [57].

Regula de raportare a valorilor critice diferă în funcție de faptul dacă este vorba de o primă valoare critică obținută, sau de una obținută la repetarea testării. Primul rezultat critic trebuie raportat imediat clinicianului, iar rezultatele critice ulterioare se comunică conform unui protocol stabilit cu secția clinică. Este important de menționat că procedura de raportare a valorilor critice în fiecare instituție trebuie să fie rezultatul unui acord între laborator și clinicieni [60].

Recomandări

1. Laboratoarele de hemostază sunt încurajate să își definească/ extindă propriile limite de valori critice relevante în concordanță cu opinia clinicienilor.
2. Primul rezultat critic trebuie raportat imediat clinicianului, iar cele ulterioare se comunică conform unui protocol stabilit cu secția clinică.
3. O valoare a INR > 5.0 este considerată clinic relevantă și necesită intervenție promptă pentru a reduce efectul anticoagulant al AVK.
4. Intervalul terapeutic pentru APTT ratio trebuie să fie de 1.5 - 2.5 ori mai mare decât limita superioară a intervalului de referință. Valori mai mari sugerează risc de sângerare și trebuie discutate cu clinicianul.
5. Valori ale fibrinogenului < 0.8g/L indică un risc ridicat de sângerare și trebuie raportate imediat clinicianului.

REZUMAT

Un sondaj recent efectuat în laboratoarele din Croația a evidențiat o mare variabilitate în practicile laboratoarelor privind testele de coagulare [5]. Acest fapt nu este surprinzător având în vedere că laboratoarele operează la diferite nivele ale sistemului de sănătate și în cadrul unor societăți profesionale diferite.

Obiectivul acestui document a fost să furnizeze recomandări de bază privind etapa preanalitică, analitică și postanalitică a procesului de testare pentru testele de coagulare cele mai frecvente. Cu toate acestea, pot exista diferențe în soluțiile tehnologice între laboratoarele mici și cele cu volum mare de lucru.

Testarea coagulării devine tot mai mult integrată în sisteme total automatizate, care îmbunătățesc calitatea, eficiența și managementul pacienților, odată cu reducerea costurilor; principiul testelor rămâne însă același. Independent de numărul testelor integrate în procesul de automatizare, testele de hemostază necesită niște abilități specifice [61]. Utilizarea adecvată a informațiilor este de importanță majoră, la fel ca și recunoașterea surselor potențiale de eroare din procesul total de testare.

Astfel, sperăm că aceste recomandări vor fi utile în practica curentă pentru laboratoarele care efectuează de rutină teste de hemostază.

Deoarece informațiile colectate se bazează pe ghiduri publicate anterior, pe rapoarte ale comitetelor de experți sau consensuri ale experților puterea evidenței nu este atât de mare.

Cu toate acestea, considerăm că aceste recomandări reprezintă un pas înainte către standardizarea procedurilor și generează date universal acceptate în rândul laboratoarelor din Croația (Anexa 1).

Anexa 1 cuprinde un rezumat al tuturor recomandărilor din acest ghid.

CONFLICTE DE INTERESE

În publicația originală, autorii articolului au declarat că nu există potențiale conflicte de interese.

Traducătorul versiunii în limba română declară că nu există conflicte de interese.

Revista Română de Medicină de Laborator (RRML), ca publicație oficială a Asociației de Medicină de Laborator din România (AMLR), declară că nu există conflicte de interese. Articolul original a fost tradus strict în scop educativ.

Publisher's Note: The Editorial Office stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERINȚE

- Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93:327-58. DOI: 10.1152/physrev.00016.2011
- Bonar R, Favaloro EJ, Adcock DM. Quality in coagulation and haemostasis testing. *Biochem Med (Zagreb).* 2010;20:184-99. DOI: 10.11613/BM.2010.023
- Harris NS, Bazydlo LAL, Winter WE. A Primer on Haemostasis for Clinical Chemists. *Clinical Laboratory News* 2012. Available at: <https://www.aacc.org/publications/cln/articles2012/January/coagulation-tests>. Accessed March 17th 2016.
- Chandler WL, ed. Initial evaluation of hemostasis: reagent and method selection. In: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 63-71. DOI: 10.1002/9781444303575.ch7
- Favaloro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in haemostasis. *Lab Med.* 2012;43:1-10. DOI: 10.1309/LM749BQETKYPYPVM
- Bronić A, Coen Herak D, Margetić S, Milić M. Policies and practices in haemostasis testing among laboratories in Croatia: a survey on behalf of a Working Group for Laboratory Coagulation of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med (Zagreb).* 2017;27:199-216. DOI: 10.11613/BM.2017.022
- Lippi G, Favaloro EJ, eds. Causes of errors in medical laboratories. In Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 22-31. DOI: 10.1002/9781118543467.ch3
- Magnette A, Chatelain M, Chatelain B, Ten Cate H, Mullier F. Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories. *Thromb J.* 2016;14:49. DOI: 10.1186/s12959-016-0123-z
- Lippi G, Favaloro EJ. Preanalytical Issues in Hemostasis and Thrombosis Testing. *Methods Mol Biol.* 2017;1646:29-42. DOI: 10.1007/978-1-4939-7196-1_2
- Nikolac N, Šupak-Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: national recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med (Zagreb).* 2013;23:242-54. DOI: 10.11613/BM.2013.031
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline-Fifth Edition.* CLSI document H21-A5. Wayne: CLSI; 2008.
- Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum Specimen Volume Requirements for Routine Coagulation Testing Dependence on Citrate Concentration. *Am J Clin Pathol.* 1998;109:595-9. DOI: 10.1093/ajcp/109.5.595
- Bennett ST, ed. *Collection of Coagulation Specimens.* In: Bennett ST, Lehman CM, Rodgers GM, eds. *Laboratory Hemostasis- A Practical Guide for Pathologists.* Basel: Springer International Publishing Switzerland; 2015. p.19-32. DOI: 10.1007/978-3-319-08924-9_2
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Gu- idi GC, Favaloro EJ. Quality Standards for Sample Collection in Coagulation Testing. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38: 565-75. DOI: 10.1055/s-0032-1315961
- Laxson CJ, Titler MG. Drawing coagulation studies from arterial lines; an integrative literature review. *Am J Critical Care.* 1994;3:16-22. DOI: 10.4037/ajcc1994.3.1.16
- Adcock Funk D, ed. Sample integrity and preanalytical variables. In: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 45-56. DOI: 10.1002/9781118543467.ch5
- Suchsland J, Friedrich N, Grotevendt A, Kallner A, Lüdemann J, Nauck M, Petersmann A. Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:1187-91. DOI: 10.1515/cclm-2014-0038
- Marlar RA, Potts MR, 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;126:400-5. DOI: 10.1309/RRQKT2JEYV33D19D
- Lippi G, Plebani M, Favarolo EJ. Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:258-66. DOI: 10.1055/s-0032-1328972
- Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ. Quality Standards for Sample Processing, Transportation, and Storage in Hemostasis Testing. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38:576-85. DOI: 10.1055/s-0032-1319768
- van Geest-Daalderop JH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJ, Hoekstra MM, van den Besselaar AM. 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;51:561-8. DOI: 10.1373/clinchem.2004.043174
- Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of haemophilia and von Willebrand Disorder due to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Path.* 2004;122:686-92. DOI: 10.1309/E4947DG48TVY19C2
- Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, Favaloro EJ, Lippi G. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clin Biochem.* 2016;49:1399-401. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.10.009
- Gosselin RC, Honeychurch K, Kang HJ, Dwyre DM. Effects of storage and thawing conditions on coagulation testing. *Int J Lab Hematol.* 2015;37:551-9. DOI: 10.1111/ijlh.12342
- Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol.* 2013;35:1-13. DOI: 10.1111/ijlh.12004
- Gardiner C, Kitchen S, Dauer RJ, Kottke-Marchant K, Adcock DM. Recommendations for evaluation of coagulation analyzers. *Lab Hematol.* 2006;12:32-8. DOI: 10.1532/LH96.05031
- Kitchen S, Preston EF, Olson JD, eds. Internal Quality Control in the hemostasis Laboratory. In: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 57-64. DOI: 10.1002/9781118543467.ch6
- Preston EF, Kitchen S, Srivastava A, eds. External Quality Assessment in Hemostasis: Its Importance and Significance. In: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 65-76. DOI: 10.1002/9781118543467.ch7
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline-Second Edition H47-A2,* Wayne: CLSI; 2008.
- Tripodi A, ed. Monitoring Oral Anticoagulant Therapy. In: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 253-63. DOI: 10.1002/9781118543467.ch22

31. Bonar R, Favaloro EJ. Explaining and reducing the variation in inter-laboratory reported values for International Normalised Ratio. *Thromb Res.* 2017;150:22-9. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.12.007
32. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for Validation of INR and Local Calibration of PT/INR Systems; Approved Guideline. CLSI guideline H54-A. Wayne: CLSI; 2005.
33. Croatian Chamber of Medical Biochemists. [Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije.] Available at: <http://www.hkmb.hr/obavijesti/obavijesti-index.html>. Accessed March 21th 2016. (in Croatian).
34. Lippi G, Favaloro EJ. Activated partial thromboplastin time: New tricks for an old dogma. *Semin Thromb Hemost.* 2008;34:604-11. DOI: 10.1055/s-0028-1104539
35. Johnston M, ed. Monitoring Heparin Therapy. In: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 224-52. DOI: 10.1002/9781118543467.ch21
36. Brill-Edwards P, Gunsberg JS, Johnston M, Hirsh J. Establishing a therapeutic range for heparin therapy. *Ann Intern Med.* 1993;119:104-9. DOI: 10.7326/0003-4819-119-2-199307150-00002
37. Marlar RA, Gausman J. The optimum number and types of plasma samples necessary for an accurate activated partial thromboplastin time - based heparin therapeutic range. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:77-82. DOI: 10.5858/arpa.2011-0516-OA
38. Laposata M, Green D, Van Cott EM, Barrowcliffe TW, Godnight SH, Sosolik RC. College of American Pathologists Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy; the clinical use and laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin, danaparoid, hirudin and related compounds, and argatroban. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122:799-807
39. Rodgers GM, Lehman CM, eds. Hemostasis Screening Assays. In: Bennett ST, Lehman CM, Rodgers GM. *Laboratory Hemostasis: A Practical Guide for Pathologists*. Basel: Springer International Publishing Switzerland; 2007. p.85-101. DOI: 10.1007/0-387-36840-X_5
40. Teruya J. Thrombin Time. Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/2086278-overview>. Accessed March 21th 2016.
41. Ariens RA. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. *J Thromb Haemost.* 2013;11:294-305. DOI: 10.1111/jth.12229
42. Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GDO. On Behalf of the Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol.* 2003;121:396-404. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04256.x
43. van den Besselaar AMHP, van Rijn CJJ, Cobbaert CM, Reijnders GLA, Hollestelle MJ, Niessen R. et al. Fibrinogen determination according to Clauss: commutability assessment of International and commercial standards and quality control samples. *Clin Chem Lab Med.* 2017; 55:1761-9. DOI: 10.1515/cclm-2016-1088
44. Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thromb Res.* 2010;126:e428-33. DOI: 10.1016/j.thromres.2010.09.004
45. Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inaccuracy of the "derived" fibrinogen measurement. *Blood Coagul Fibrinol.* 1994;5:955-7. DOI: 10.1097/00001721-199412000-00012
46. Olson JD, Cunningham MT, Higgins RA, Eby CS, Brandt JT. D-dimer: simple test, tough problems. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:1030-8. DOI: 10.5858/arpa.2012-0296-CP
47. Lippi G, Tripodi A, Simundic AM, Favaloro EJ. International survey on D-dimer test reporting: a call for standardization. *Semin Thromb Hemost.* 2015;41:287-93. DOI: 10.1055/s-0035-1549092
48. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quantitative D-Dimer for the Exclusion of Venous Thromboembolic Disease; Approved Guideline H59-A. Wayne: CLSI; 2011.
49. Oude Elferink RFM, Loo AE, Van de Klashorst CGJ, Hulsebos-Huygen M, Piersma-Wichers M, Oudega R. Clinical evaluation of eight different D-dimer test for the exclusion of deep venous thrombosis in primary care patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75:230-8. DOI: 10.3109/00365513.2014.993697
50. Douma RA, Tan M, Schutgens RE, Bates SM, Perrier A, Legnani C et al. Using an age-dependent D-dimer cut-off value increases the number of older patients in whom deep vein thrombosis can be safely excluded. *Haematologica.* 2012;97:1507-13. DOI: 10.3324/haematol.2011.060657
51. Favaloro EJ, Lippi G. Laboratory reporting of haemostasis assays: The final post-analytical opportunity to reduce errors of clinical diagnosis in hemostasis? *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:309-21. DOI: 10.1515/CCLM.2010.061
52. Marlar RA, ed. Hemostasis test validation, performance, and reference intervals: international recommendations and guidelines. In: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, eds. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 13-21. DOI: 10.1002/9781118543467.ch2
53. Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hematol.* 2017;39:121-27. DOI: 10.1111/ijlh.12661
54. Ignjatovic V, Kenet G, Monagle P, on behalf of the Perinatal and Paediatric Haemostasis Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Developmental hemostasis: recommendations for laboratories reporting paediatric samples. *J Thromb Haemost.* 2012;10:298-300. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04584.x
55. Tripodi A, Lippi G, Plebani M. How to report results of prothrombin and activated partial thromboplastin times. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54:215-22. DOI: 10.1515/cclm-2015-0657
56. Vasikaran S, Sikaris K, Kilpatrick E, French J, Badrick T, Osypiw J, Plebani M. IFCC WG harmonization of quality assessment of interpretative comments. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54:1901-11. DOI: 10.1515/cclm-2016-0709
57. Lippi G, Adcock D, Simundic AM, Tripodi A, Favaloro EJ. Critical laboratory values in hemostasis: toward consensus. *Ann Med.* 2017;49:455-461. DOI: 10.1080/07853890.2016.1278303
58. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th ed.). *Chest.* 2008;133:160S- 98S. DOI: 10.1378/chest.08-0670
59. Pai M, Moffat KA, Plumhoff E, Hayward CM. Critical values in the coagulation laboratory: results of a survey of the North American Specialized Coagulation Laboratory Association. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:836-41. DOI: 10.1309/AJCP8O8GIPPPNUH
60. Don-Wauchope AC, Chetty VT. Laboratory defined critical value limits: how do hospital physicians perceive laboratory based critical values? *Clin Biochem.* 2009;42:766-70. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.02.016
61. Huber AR, Méndez A, Brunner-Agten S. Automation in haemostasis. *Hamostaseologie.* 2013;33:295-8. DOI: 10.5482/HAMO-12-05-0002

Anexa 1. Recomandări pentru procedurile din etapa pranalitică, analitică și postanalitică pentru testarea timpului de protrombină (PT), timpului de tromboplastină parțială activată (APTT), timpului de trombină (TT), fibrinogenului și D-dimerilor

RECOMANDĂRI PENTRU ETAPA PREANALITICĂ		Ref.
Solicitare test	Informațiile despre diagnosticul prezumtiv sau cunoscut precum și despre tratamentul anticoagulant urmat de pacient trebuie să facă parte integrantă din solicitarea testelor de coagulare	10
Pregătire și identificare pacient	Pregătirea pacientului înainte de efectuarea puncției venoase și identificarea adecvată a pacientului în timpul recoltării de sânge trebuie să respecte recomandările naționale pentru recoltarea de sânge	10
Tuburi și anticoagulant	1) Probele de sânge venos pentru teste de coagulare trebuie recoltate în tuburi din sticlă sau din plastic având la interior suprafețe non activante	11,13
	2) Tuburile trebuie să conțină anticoagulant citrat trisodic tamponat, preferabil 105-109 mmol/L, respectiv 3.2%.	11
	3) Proporția între volumul sânge și cel de anticoagulant în tubul de recoltare trebuie să fie întotdeauna 9:1.	11
	4) Se consideră acceptabilă o abatere de +/- 10% de la linia de umplere marcată pe tub	11,12-14
Recoltarea de sânge	1) Recoltarea de sânge trebuie să respecte recomandările naționale pentru recoltarea de sânge venos	10
	2) Înainte de recoltarea de sânge pentru teste de coagulare dintr-un cateter venos, se recomandă spălarea cateterului venos central cu ser fiziologic și îndepărtarea primilor 5 ml de sânge, sau de 6 ori spațiul mort al cateterului. Dacă probele sunt recoltate dintr-un cateter venos periferic, se îndepărtează un volum de sânge echivalent cu de 2 ori spațiul mort al cateterului și extensiei sale	8,10, 11,15
Ordinea recoltării tuburilor	1) Tubul pentru teste de coagulare trebuie recoltat înaintea tuburilor cu alți aditivi.	11,13,14
	2) Nu este necesară recoltarea unui tub inițial care să fie îndepărtat înaintea recoltării pentru teste de coagulare de rutină și D dimeri. Excepție când se recoltează cu branulă cu fluturaș (aerul din sistem previne umplerea completă), caz în care se recoltează inițial sânge într-un tub fără aditiv, tub care va fi îndepărtat.	10,11,14
Respingerea probelor	Fiecare laborator trebuie să își stabilească criterii bine definite de respingere a probelor neconforme pentru testele de coagulare	8,11,16
Prelucrarea probelor	1) Probele de plasmă pentru testele screening PT, APTT, TT, fibrinogen și D-dimeri se prepară prin centrifugarea tubului primar la temperatura ambiantă (18-25 °C), la 1500xg timp de 15 minute.	11,13,17
	2.) Toate probele de plasmă care trebuie congelate până la testare trebuie să fie dublu centrifugate înainte de congelare pentru a obține plasma săracă în plachete (platelet poor plasma, PPP), care conține < 10 x10 ⁹ plachete/L .	16,17
Probe cu hematocrit ridicat (>55%)	1) Concentrația finală de citrat în tub trebuie ajustată pentru a menține raportul de 9:1 între volumul de sânge și cel de anticoagulant în probele de sânge la care hematocritul este >55%	11,18
	2) Pe buletinul cu rezultate se va menționa că volumul de citrat a fost ajustat din cauza valorilor crescute ale hematocritului: “Testele de coagulare s-au efectuat din probă cu volum ajustat de anticoagulant (citrat), din cauza valorii crescute a hematocritului (Hct = xx L/L)”, unde xx reprezintă valoarea exactă a hematocritului.	11,13,18
Hemoliza, lipemia și hiperbilirubinemia	1) Pentru testele screening de coagulare, laboratoarele trebuie să își stabilească concentrația de substanțe interferente acceptabilă pentru propriu sistem echipament/reactiv.	19,20
	2) Suspiciunea de hemoliză intravasculară (in vivo) se menționează alături de raportarea rezultatului	11,19,20
	3) Utilizarea metodelor mecanice și/sau electromecanice de detecție a cheagului este recomandată în toate cazurile de probe cu substanțe care interferează cu transmiterea luminoasă	11
Păstrarea probelor până la testare	1) Tuburile pentru testele de hemostază se păstrează închise, la temperatura camerei (18-25 °C) până la testare.	11,12,20
	2) Testarea pentru toate testele de coagulare trebuie făcută în 4 ore de la recoltare. Excepția de la această regulă se aplică la PT și D Dimeri, pentru care probele se pot păstra la temperatura camerei până la 24 de ore de la recoltare, fie centrifugate fie necentrifugate, fără separarea plasmei, în tuburi închise.	11,20,21
	3) Laboratoarele care acceptă pentru testarea PT și a D dimerilor probe stocate pentru 24 de ore trebuie să verifice stabilitatea acestora pentru sistemul propriu.	21
	4) Dacă APTT se solicită pentru monitorizarea tratamentului cu heparină nefracționată, probele trebuie centrifugate și plasma trebuie separată în decurs de o oră de la recoltare.	11,16,21
	5) Dacă efectuarea testelor de hemostază nu e posibilă în intervalul recomandat, plasma se separă prin centrifugare și este congelată imediat la -20 °C pe termen scurt (< 2 săptămâni) sau la -70 °C până la 6 luni.	16,20
Transportul probelor la laboratoare aflate la distanță	1) Probele trebuie să ajungă la laborator în intervalul de timp recomandat pentru fiecare test. Dacă nu este posibil, probele trebuie să fie procesate și plasmele congelate conform procedurii descrise mai sus	16,20
	2) Fiecare tub care este trimis la un laborator aflat la distanță trebuie etichetat cu numele complet al pacientului, data nașterii, un număr de identificare (numărul asigurării, numărul de identificare unic din laborator). Se menționează de asemenea tipul de probă (plasma citratată), data și ora recoltării.	16,20
	3) Probele congelate de plasmă se transportă pe gheață uscată (preferabil), sau pe gheață în containere de polistiren, astfel încât probele să rămână complet congelate până la ajungerea în laborator	5,8,11
Decongelarea probelor congelate	1) Decongelarea probelor congelate trebuie să fie rapidă, timp de 10 minute la 37 °C în termostat, dry-thermo block sau în baie de apă	5,16, 20,23
	2) Anterior testării, după decongelare, proba trebuie agitată pentru a fi omogenizată prin răsturnarea blândă a tubului la 180° și revenirea la poziția inițială de 6 ori	23

Anexa 1. (continuare)

RECOMANDĂRI PENTRU ETAPA ANALITICĂ		
Controlul de calitate	1) Controlul intern trebuie făcut întotdeauna după deschiderea sau/și reconstituirea reactivilor, calibrare, după procedurile periodice de întreținere/service sau după depanarea defecțiunilor echipamentului	27
	2) Pentru testele cantitative, controlul trebuie să includă minimum două niveluri (normal și patologic) care trebuie rulate la fiecare 8 ore în cazul operării continue. Se admit scheme diferite de control intern în cazul în care laboratorul și-a analizat procesul de lucru și a analizat riscul.	27,29
	3) Controlul extern trebuie să fie o parte esențială din sistemul de management al calității din laborator	27,29
Testele de coagulare	Pentru implementarea coagulometrelor în practica de rutină, evaluarea și validarea trebuie făcute conform recomandărilor publicate	26
Timpul de protrombină	1) Pentru determinarea PT se recomandă utilizarea tromboplastinelor recombinante cu valori ISI < 1,2.	29-33
	2) Se recomandă utilizarea unui ISI specific pentru combinația coagulometru/reactiv de câte ori este posibil. În cazul în care ISI specific nu este disponibil, se recomandă determinarea ISI local.	29,30,32
Timpul de tromboplastină parțială activată	1) Pentru efectuarea APTT ca test screening, se recomandă folosirea reactivilor APTT sensibili la deficitul de factori și la heparine nefracționate, dar insensibili la lupus anticoagulant.	4,29,34
	2) APTT este un test adecvat pentru monitorizarea tratamentului cu heparine nefracționate	35
	3) Dacă APTT se folosește pentru monitorizarea tratamentului cu heparine nefracționate, recomandarea generală pentru laboratoare este să testeze sensibilitatea reactivului APTT pentru a putea stabili intervalul terapeutic	35-37
	4) APTT nu se folosește pentru monitorizarea tratamentului cu heparine cu masă moleculară joasă. Pentru estimarea răspunsului la heparine cu masă moleculară joasă se folosește exclusiv activitatea anti-Xa.	38
Timpul de trombină	Timpul de trombină nu trebuie utilizat pentru monitorizarea terapiei anticoagulante cu heparină sau alți inhibitori ai trombinei, deoarece este sensibil la aceștia și nu este standardizat pentru acest scop.	39,40
Fibrinogen	1) Testul funcțional pentru fibrinogen este metoda cea mai fiabilă, fiind recomandat pentru utilizarea de rutină în laboratorul clinic.	42
	2) Testele imunologice care măsoară concentrația fibrinogenului ca antigen sunt recomandate pentru investigarea disfibrinogenemiilor	39,42
	3) Metoda de dozare ca fibrinogen PT derivat nu este recomandată pentru practica de rutină în laborator.	42,44,45
D-dimeri	1) Rezultatele, intervalele de referință și valoarea clinică a cut-off pentru D-dimeri trebuie interpretate ținând cont de metoda utilizată.	47,48
	2) Metoda de dozare pentru D-dimeri trebuie menționată în buletinul de rezultate	48-50
RECOMANDĂRI PENTRU ETAPA POSTANALITICĂ		
Intervale de referință, valori cut-off și raportare armonizată a rezultatelor	Dacă intervalele de referință sunt preluate din literatură sau de la producători, se recomandă verificarea ca aceste intervale să fie adecvate pentru populația locală	25,53
	Folosirea intervalelor adaptate pe grupe de vârstă este esențială pentru a asigura managementul adecvat al copiilor cu tromboze sau cu perturbări hemoragice	54
Raportare PT	1) Rezultatele pentru PT trebuie raportate procentual dacă pacientul nu este pe tratament cu AVK.	29,30,51
	2) INR nu trebuie raportat la pacienții care nu primesc AVK.	30
	3) Sistemul de raportare ca INR trebuie folosit exclusiv pentru monitorizarea tratamentului cu AVK.	29,30
Raportare APTT	Rezultatul APTT trebuie raportat atât în secunde cât și ca raport (ratio).	29, 35-37
Raportare TT	TT trebuie raportat în secunde	39,40
Raportare fibrinogen	Rezultatele pentru fibrinogen trebuie exprimate ca g/L	42
Raportare D-dimeri	1) Rezultatele pentru D-dimeri trebuie raportate în mg/L DDU sau FEU.	46-48
	2) Metoda de dozare a D-dimerilor se menționează pe buletinul de analize împreună cu rezultatul	46-48
	3) Se evită utilizarea kiturilor care nu furnizează informații despre tipul de unități (DDU sau FEU) folosite.	46-48
Comentarii interpretative	Se recomandă adăugarea de comentarii interpretative adecvate, legate atât de faza preanalitică cât și de cea analitică a procesului de testare, precum și recomandări pentru testări suplimentare, acolo unde se impune.	56
Raportarea valorilor critice	1) Laboratoarele de hemostază sunt încurajate să își definească propriile limite de valori critice relevante și/sau să își extindă lista existentă de valori critice în concordanță cu opinia clinicienilor	57, 59
	2) Primul rezultat critic trebuie raportat imediat clinicianului, iar rezultatele critice ulterioare se comunică conform unui protocol stabilit cu secția clinică.	57, 59
	3) O valoare a INR peste 5.0 este considerată clinic relevantă și necesită intervenție promptă pentru a reduce efectul anticoagulant al AVK.	58
	4) Intervalul terapeutic pentru APTT ratio trebuie să fie de 1.5- 2.5 ori mai mare decât limita superioară a intervalului de referință. Valori mai mari ale APTT ratio sugerează risc de sângerare și trebuie discutate cu clinicianul	57
	5) Valori ale fibrinogenului mai mici de 0.8 g/L indică un risc ridicat de sângerare și trebuie raportate imediat clinicianului	57,59