

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Nacionalne preporuke za postupke uzorkovanja, pripreme i analize uzoraka te izvještavanje rezultata probirnih koagulacijskih pretraga: protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, trombinskog vremena, fibrinogena i D-dimera

Sažetak

Moderni dijagnostički laboratoriji nude širok spektar koagulacijskih pretraga koje se koriste u dijagnostici i liječenju bolesnika s hemostatskim poremećajima, u preoperativnom probiru te praćenju antikoagulacijske terapije. Nedavno provedeno istraživanje među medicinsko biokemijskim i transfuziološkim laboratorijima u Republici Hrvatskoj pokazalo je različitu praksu i način postupanja u pojedinim fazama laboratorijskog rada pri izradi koagulacijskih pretraga i istaknulo je područja koja zahtijevaju poboljšanja. Nedostatak standardizacije postupaka i neharmonizirani rezultati između različitih mjernih metoda mogu uzrokovati pogrešne odluke u liječenju i time ugroziti sigurnost bolesnika. Stoga su u ovim preporukama sažeti standardizirani postupci u prijeanalitičkoj, analitičkoj i poslijeanalitičkoj fazi izrade probirnih koagulacijskih pretraga protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, trombinskog vremena, fibrinogena i D-dimera, kako bi pomogli laboratorijima u dobivanju točnih i pouzdanih rezultata ispitivanja.

Uvod

Haemostaza je fiziološki odgovor na ozljedu. Rezultat je složenog međudjelovanja između krvnih žila, trombocita i faktora zgrušavanja iz plazme s glavnom funkcijom zaustavljanja krvarenja na mjestu ozljede krvne žile uz održavanje protoka krvi u intaktnim krvnim žilama (1).

Moderni dijagnostički laboratorij nudi širok spektar koagulacijskih pretraga koje se koriste u dijagnostici i liječenju bolesnika s hemostatskim poremećajima, preoperativnom probiru i praćenju antikoagulacijske terapije (2). Među njima, protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) i fibrinogen su najčešće pretrage probiranja, koje pružaju brzu iako nespecifičnu informaciju o prirodi hemostatskih poremećaja (3). Rezultati ovih probirnih pretraga, zajedno s bolesnikovom povijesti bolesti, usmjeravaju dijagnostiku prema specifičnim pretragama za ispitivanje poremećaja sustava hemostaze. Komercijalno je dostupan velik broj različitih testova koji se metodološki razlikuju, a nedostatak standardizacije, i neharmonizirani rezultati između različitih mjernih metoda mogu dovesti do pogrešne odluke u liječenju bolesnika (4). Slijedom toga, sigurnost bolesnika može biti ugrožena, uzrokujući ujedno i dodatne troškove zdravstvene zaštite (5).

Nedavno provedeno istraživanje među medicinsko biokemijskim i transfuziološkim laboratorijima u Republici Hrvatskoj (RH) pokazalo je različitu praksu i postupanje u pojedinim fazama laboratorijskog rada prilikom izrade koagulacijskih pretraga i istaknula je područja koja zahtijevaju poboljšanja (6). S obzirom na potrebu standardiziranja i usklađivanja cjelokupnog laboratorijskog procesa pri određivanju poremećaja sustava hemostaze na nacionalnoj razini, u ovim preporukama je sažet pregled postupaka u prijeanalitičkoj, analitičkoj i poslijeanalitičkoj fazi određivanja probirnih koagulacijskih pretraga PV, APTV, trombinskog vremena (TV), fibrinogena i D-dimera.

Materijali i metode

Preporuke za postupke u prijeanalitičkoj, analitičkoj i poslijeanalitičkoj fazi laboratorijskog rada pri određivanju probirnih koagulacijskih pretraga PV-a, APTV-a, TV-a, fibrinogena i D-dimera izradila je Radna grupa za laboratorijsku koagulaciju (RGZLK) koju je osnovalo Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM). Izrada preporuka potaknuta je rezultatima istraživanja koje je RGZLK provela tijekom 2015. godine među medicinsko biokemijskim i transfuziološkim laboratorijima u RH koji izvode koagulacijske pretrage (6). Podaci prikazani u ovim preporukama prikupljeni su pretraživanjem baza podataka PubMed i Ovid, kao i relevantnih publikacija Zavoda za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical & Laboratory Standards Institute*; CLSI), Britanskog društva za hematologiju (engl. *British Society for Hematology*; BSH) i Međunarodnog društva za trombozu i hemostazu (engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*, ISTH). Ključne riječi koje su korištene u pretraživanju bile su prijeanalitička, analitička i poslijeanalitička faza ispitivanja hemostaze i/ili koagulacije, koagulacijske pretrage, pretrage hemostaze, PV, internacionalni normalizirajući omjer (INR), APTV, TV, fibrinogen, D-dimeri, preporuke za izvođenje koagulacijskih pretraga i/ili pretraga hemostaze tumačenje rezultata pretraga, standardizacija i / ili harmonizacija u ispitivanju hemostaze.

Prijeanalitička faza rada pri izradi koagulacijskih pretraga

Prijeanalitička faza rada u laboratoriju uključuje sve postupke koji se provode od vremena kada liječnik podnese zahtjev za određenom laboratorijskom pretragom, pa sve do vremena kad je uzorak spreman za analizu. Većina laboratorijskih grešaka događa se upravo u prijeanalitičkoj fazi rada (5, 7). Budući da se greške nastale u prijeanalitičkoj fazi rada često prepoznaju tek u analitičkoj i poslijeanalitičkoj fazi, potrebno je osigurati stroge kontrolne mehanizme prijeanalitičke faze kako bi se rizik od grešaka izbjegao ili smanjio na najmanju moguću mjeru (7-9). Uzorkovanje krvi najsloženiji je postupak u

prijeanalitičkoj fazi rada i stoga je najpodložniji pogreškama. Standardizirani postupci za uzorkovanje krvi opisani su u prethodno objavljenim Nacionalnim preporukama za uzimanje uzoraka venske krvi i potrebno ih je slijediti, a u daljnjem tekstu će se raspraviti postupci specifični za prijeanalitičku fazu rada izrade koagulacijskih pretraga (10).

Zahtjev za pretragama - uputnica

Nedavno provedeno istraživanje među dijagnostičkim laboratorijima koji izrađuju koagulacijske pretrage kao jedan od glavnih problema istaknulo je nedostatak informacija na uputnici (6). Nedostatak odgovarajućih informacija kao što su radna ili potvrđena dijagnoza, odnosno podaci o antikoagulacijskoj terapiji može dovesti do pogrešnog tumačenja rezultata analize, izvođenja dodatnih pretraga ili ponavljanja pretraga što u konačnici rezultira i dodatnim troškovima. Stoga, uz zatražene koagulacijske pretrage, informacije o radnoj ili potvrđenoj dijagnozi, kao i podatak o antikoagulacijskoj terapiji trebaju biti sastavni dio uputnice (10). Njihova dostupnost izrazito je važna za ispravno izvještavanje i tumačenje rezultata.

Priprema i identifikacija bolesnika

Preporuke za pripremu bolesnika prije uzimanja venskih uzoraka krvi kao i odgovarajući način identifikacije bolesnika tijekom uzorkovanja dio su Nacionalnih preporuka za uzimanje venskih uzoraka te su primjenjive i za koagulacijske pretrage (10).

Spremnici za uzorkovanje i antikoagulans

Uzorci venske krvi za koagulacijske pretrage uzimaju se u staklene ili plastične spremnike s neaktivirajućom površinom. Stoga, stakleni spremnici trebaju biti silikonizirani, a plastični moraju sadržavati polipropilen kao neaktivirajući materijal (11, 13). Spremnici trebaju sadržavati puferirani trinatrijev citrat kao antikoagulans u preporučenoj koncentraciji od 105-109 mmol/L, tj. 3,2% trinatrijev citrat. Iako su na tržištu dostupni spremnici s 129 mmol/L tj. 3,8% trinatrijevim citratom, važno je naglasiti da se referentni intervali i rezultati

pretraga mogu razlikovati između uzoraka prikupljenih u spremnike s različitim koncentracijama citrata. Na primjer, u uzorcima uzetim uz 3,8% trinatrijev citrat kao antikoagulans, vrijeme zgrušavanja PV-a i APTV-a može biti kraće, a fibrinogena dulje u odnosu na vrijednosti dobivene uz 3,2% trinatrijev citrat, što je značajno ako se koriste referentni intervali određeni u uzorcima plazme prikupljenim u spremnike s 3,2% trinatrijevim citratom (11-13). Stoga je glavna preporuka da laboratoriji standardiziraju uporabu spremnika i koriste uvijek one s istom koncentracijom trinatrijevog citrata, po mogućnosti 3,2% (11). Ovo je važno jer se samo spremnici s 3,2% trinatrijevim citratom koriste za određivanje međunarodnog indeksa osjetljivosti tromboplastina (engl. *International Sensitivity Index*; ISI), a stoga ih preporučuju i Znanstveni i standardizacijski odbor (*The Scientific and Standardization Committee*; SSC) ISTH-a i CLSI-a (11).

Omjer krvi i antikoagulansa u spremniku treba biti 9:1. Uvijek je potrebno uzorkovati točnu količinu krvi koja je naznačena na spremniku, kako bi se osigurao odgovarajući omjer krvi i antikoagulansa te dobili točni rezultati (11). Iako su rezultati nekoliko nedavnih istraživanja pokazali da bi za određene analize mogla biti prihvatljiva i veća odstupanja, još uvijek je općeprihvaćena preporuka o dozvoljenom odstupanju od +/-10%, što odgovara 90 do 110% količine naznačene na spremniku (12 -14).

Uzorkovanje krvi

Uzorci krvi trebali bi se uzeti iz periferne vene, bez traume i na mjestu udaljenom od intravenskog katetera ukoliko je prisutan. Postupci koji se odnose na uzorkovanje, uključujući vrijeme trajanja podveze i miješanje spremnika, trebaju biti u skladu s prethodno objavljenim preporukama (8, 10, 11). Za bolesnike kod kojih nije moguće izvaditi krv na ovaj način, uzorkovanje se izvodi putem intravenskog sustava (katetera) za vađenje krvi. Ukoliko je kateter prethodno ispran heparinom, treba izbjegavati istodobno uzorkovanje (11,15). Prije sakupljanja krvi u koagulacijske spremnike, CLSI preporučuje ispiranje katetera fiziološkom otopinom i odbacivanje prvih 5 mL krvi ili mrtvog volumena

koji odgovara šesterostrukom volumenu katetera (11, 15). Kada se uzorci skupljaju iz zatvorenog venskog sustava, treba odbaciti dva volumena katetera. Ukoliko su uzorci prikupljeni na ovaj način to je uvijek potrebno navesti na uputnici i nalazu, a pri interpretaciji rezultata u obzir treba uzeti mogućnost kontaminacije heparinom i razrjeđivanja uzorka (11).

Redoslijed uzorkovanja spremnika

Kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije uzoraka za koagulacijske pretrage, uzorkovanje je potrebno provesti prema točno određenom redoslijedu čime se sprječava mogućnost dobivanja pogrešnih rezultata analize uslijed prenošenja aditiva i mogućeg stvaranja mikrougrušaka u spremniku (10-14). Koagulacijski spremnik treba uzorkovati prije bilo kojeg drugog spremnika s aditivom (koji sadrži aktivatore ugruška tj. trombin) ili antikoagulansima poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), litijevog heparina i inhibitora glikolize (11, 13, 14).

Prema nedavno objavljenim istraživanjima, nije potrebno vaditi spremnik koji se odbacuje prije prikupljanja uzoraka za probirne koagulacijske pretrage i D-dimere (10, 11, 14). Izuzetak od ovog pravila uključuje postupak kada se koriste leptirići za uzorkovanje, budući da zrak u sustavu za vađenje može utjecati na punjenje spremnika a time i na omjer krvi i antikoagulansa u spremniku. Spremnik koji se odbacuje u ovom slučaju mora biti bez aditiva (10,11).

Neprihvatanje uzoraka

Svaki laboratorij mora imati definirane kriterije za neprihvatanje koagulacijskih uzoraka, uključujući i uzorke koji ne stignu u laboratoriju odgovarajućem vremenskom razdoblju od uzorkovanja, neoznačene ili pogrešno označene uzorke, zgrušane uzorke, uzorke sakupljene u spremnik s pogrešnim antikoagulansom ili one s neodgovarajućim omjerom

krvi i antikoagulansa, izrazito hemolizirane uzorke i uzorke koji su prije ispitivanja bili pohranjeni u hladnjaku (8, 11, 16).

Priprema uzoraka krvi za analizu

Općenito, uzorci krvi trebaju biti pripremljeni za analizu u skladu s CLSI smjernicama, imajući u vidu specifičnosti prema kojima treba izraditi određenu pretragu (11). Većina koagulacijskih pretraga, uključujući i pretrage probira PV, APTV, TV, fibrinogen kao i D-dimere, određuju se u plazmi siromašnoj trombocitima (engl. *platelet poor plasma*, PPP) koja sadrži $<10 \times 10^9/L$ trombocita, a koja je dobivena iz primarnog spremnika za prikupljanje uzoraka nakon centrifugiranja. PPP treba pripremiti centrifugiranjem uzoraka krvi na 1500g na sobnoj temperaturi (18-25°C) tijekom najmanje 15 minuta. Kako bi se dobila zaista plazma siromašna trombocitima, može se provesti dvostruko centrifugiranje. Iako se može koristiti veća brzina i kraće vrijeme centrifugiranja, važno je napomenuti da upotreba visokih centrifugalnih sila može potaknuti aktivaciju trombocita i razgradnju eritrocita (11, 16, 17). Potrebno je izbjegavati centrifugiranje s upotrebom funkcije kočenja. Ako se koristi centrifuga s hlađenjem, centrifugiranje treba izvoditi na sobnoj temperaturi budući da niže temperature mogu dovesti do aktivacije trombocita, dok su centrifuge bez hlađenja nedgovarajuće ukoliko se pregrijavaju (11,17). Sve uzorke plazme koji se zamrzavaju do trenutka izvođenja analize potrebno je centrifugirati dva puta (16,17).

Uzorci s visokim vrijednostima hematokrita

U uzorcima s vrijednostima hematokrita (Hct), iznad 0,55 L/L, potrebno je prilagoditi konačnu koncentraciju citrata u spremniku, kako bi se održao odgovarajući omjer krvi i antikoagulansa od 9:1. Ovo je važno zbog toga što se u uzorcima s povišenim vrijednostima Hct-a, omjer krvi i antikoagulansa smanjuje ispod 9:1, uzrokujući time višak

citrata za određeni volumen plazme u spremniku. Kao prvi korak u postupku, potrebno je izračunati ostatni volumen citrata u spremniku i to primjenom slijedeće jednadžbe (11,18):

$$C(\text{mL}) = 0.185^* \times [\text{volumen krvi (mL)}]** \times [1.0 - \text{Hct (L/L)}]$$

C=ostatni volumen citrata u mL

*0,185 =konstanta

**volumen krvi u mL, ovisno o volumenu upotrebljenog spremnika

Hct = bolesnikov hematokrit (L/L)

Ostatni volumen citrata u mL treba oduzeti od ukupnog volumena citrata u spremniku, pri čemu se kao rezultat dobije volumen citrata koji treba ukloniti iz spremnika. Kako bi se u spremniku održao podtlak, pri uklanjanju antikoagulansa preporučuje se korištenje tuberkulinske štrcaljke. Ukoliko tuberkulinska štrcaljka nije dostupna, za uklanjanje citrata mogu se koristiti automatske pipete. Budući da upotreba automatskih pipeta za prilagođavanje koncentracije citrata onemogućuje održavanje podtlaka u spremniku, bolesniku je potrebno uzorkovati krv pomoću igle ili štrcaljke. Nakon uklanjanja čepa sa spremnika i prilagodbe volumena citrata, krv treba dodati do oznake. Spremnik treba ručno začepiti a uzorak dobro promiješati. Daljnje je rukovanje s uzorkom isto kao i sa svim ostalim uzorcima za koagulacijske pretrage.

Bez obzira na način kako će se ukloniti ostatni volumen citrata iz spremnika, obveza laboratorijskog osoblja je informirati korisnike o potrebi korekcije volumena citrata i odgovarajućem postupku za daljnje uzorkovanje. Na nalazu treba uvijek naznačiti da je volumen citrata u spremniku korigiran zbog visoke vrijednosti hematokrita. Ako nije moguće uzorkovati novi uzorak u spremniku s korigiranim volumenom citrata, uz rezultate na nalazu potrebno je napisati odgovarajući komentar.

Hemoliza, hiperbilirubinemija i lipemija

Interferencije kao što su hemoliza, hiperbilirubinemija i lipemija mogu utjecati na rezultate koagulacijskih pretraga (19). Ove su interferencije uglavnom rezultat spektralnog preklapanja interferirajućih supstanci (hemoglobina, bilirubina i čestica masti). Nova generacija koagulacijskih analizatora mjeri optičku apsorpciju na različitim valnim duljinama, pa se problematični uzorci mogu prepoznati prije izvođenja analize a utjecaj ovih interferirajućih supstanci tijekom ispitivanja se smanjuje automatskim odabirom odgovarajuće valne duljine (19,20). Ako je laboratorij opremljen takvim analizatorima, prihvatljivu koncentraciju interferirajućih tvari moguće je lokalno ispitati. Osim optičkih interferencija, hemolizirani uzorci mogu biti problematični i zbog preuranjene aktivacije koagulacije i onemogućenog otkrivanja ugruška (19). Stoga, kad god se posumnja na navedeno, potrebno je uzorkovati novi, nehemolizirani uzorak (11). Osim hemolize nastale *in vitro*, kao posljedica određenih medicinskih stanja može biti prisutna i intravaskularna hemoliza, odnosno hemoliza *in vivo*. Postojanje intravaskularne hemolize može se utvrditi i isključiti prije ponovnog uzorkovanja uz odgovarajuću komunikaciju i razmjenu informacija s kliničkim osobljem. U takvim slučajevima, rezultati ispitivanja trebaju biti izdani s odgovarajućim komentarom na nalazu (intravaskularna hemoliza) uz pojedinosti o pouzdanosti rezultata ispitivanja.

Optički *bias* uslijed hiperbilirubinemije uglavnom nije značajan i može se spriječiti mjerenjem na većoj valnoj duljini (tj. pri 570 nm ili više), pri čemu se rezultati analize mogu pouzdano izvijestiti (19). Slično, upotreba različitih valnih duljina i/ili većih razrjeđenja uzoraka kod pretraga u kojima se uzorak plazme razrjeđuje (npr. fibrinogen, određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja itd.) mogu spriječiti optički *bias* zbog lipemije (19). Međutim, kad god je to moguće, za analizu uzoraka koji sadrže supstance koje interferiraju uslijed spektralnog preklapanja, preporučuje se upotreba mehaničke i/ili elektromehaničke metode detekcije ugruška (11). Međutim, i unatoč toj mogućnosti, biološke interferencije

mogu imati utjecaj na rezultate koagulacijskih pretraga. Primjerice, značajna lipemija utjecat će na koagulaciju potiskivanjem plazme, što će se očitovati produljenim vremenom zgrušavanja koagulacijskih pretraga.

Pohrana uzoraka do analize

U idealnim uvjetima, sve koagulacijske pretrage potrebno je analizirati unutar 4 sata od uzorkovanja. Prema nedavnim istraživanjima, izuzetak od ovog pravila može se primijeniti za pretrage PV i D-dimeri, za koje se uzorci mogu pohraniti na sobnoj temperaturi do 24 sata nakon uzorkovanja, što se odnosi na necentrifugirane ili centrifugirane uzorke s plazmom koja ostaje iznad staničnih komponenti u zatvorenom spremniku (11, 12, 20). Međutim, kako stabilnost uzorka može ovisiti o sustavu u upotrebi (tromboplastinski reagens, koagulometar i spremnici za prikupljanje uzoraka), laboratoriji koji prihvataju uzorke za PV i D-dimere pohranjene unutar 24 sata od prikupljanja krvi, trebaju potvrditi stabilnost uzorka na vlastitom sustavu (21).

Uzorke za sve koagulacijske pretrage potrebno je do analize pohraniti u neotvorenom spremniku na sobnoj temperaturi (18-25°C). Pohrana uzoraka na niskoj temperaturi (2-8°C) se ne preporučuje zbog moguće aktivacije koagulacijskog faktora VII (FVII) i gubitka aktivnosti koagulacijskog faktora VIII (FVIII) na hladnom te posljedičnog utjecaja na rezultate PV-a i APTV-a (16, 20, 22). Ako se pretraga APTV određuje u svrhu praćenja terapije nefrakcioniranim heparinom (engl. *unfractionated heparin*; UFH), uzorke treba centrifugirati, a plazmu odvojiti od stanica unutar jednog sata od uzorkovanja, zbog potencijalne neutralizacije heparina posredovanog trombocitnim faktorom 4 (11, 16, 21).

Ako koagulacijske pretrage nije moguće izraditi unutar dozvoljenog vremena, nakon centrifugiranja plazmu treba odvojiti od stanica i odmah zamrznuti (poželjno unutar jednog sata od sakupljanja uzorka) i to na temperaturi od -20°C ili nižoj za kratkotrajnu pohranu (do dva tjedna) odnosno na temperaturi od -70°C za pohranu do šest mjeseci. Kada se iz

istog uzorka traži više pretraga, potrebno je pripremiti i smrznuti više odvojenih alikvota (16,20).

Transport uzoraka u udaljene laboratorije

Ukoliko se uzorci za koagulacijske pretrage šalju na analizu u udaljene laboratorije, potrebno ih je dostaviti u odgovarajućem vremenskom roku dozvoljenom za izradu pojedine tražene pretrage (16,20). Ako to nije moguće, uzorke krvi je potrebno dva puta centrifugirati, a potom odvojene uzorke plazme prenijeti u polipropilenski spremnik. Svaki spremnik treba biti označen punim imenom bolesnika, datumom rođenja i identifikacijskim brojem. Uz to, treba navesti informaciju o vrsti uzorka (npr. citratna plazma), datumu i vremenu uzorkovanja. Uzorak plazme treba odmah zamrznuti prema prethodno opisanom postupku. Uzorci zamrznute plazme trebaju se transportirati na suhom ledu, a ukoliko to nije moguće, na dovoljnoj količini običnog leda u spremniku od stiropora, kako bi ostali čvrsto zamrznuti dok ne stignu u laboratorij za ispitivanje. Analize se ne smiju izvoditi iz uzorka koji u laboratorij ne stigne solidno zamrznut (5, 8, 11).

Odmrzavanje zamrznutih uzoraka plazme

Odmrzavanje zamrznutih uzoraka plazme treba provesti brzo, tijekom 5-10 minuta na 37°C u inkubatoru, suhom termo bloku ili vodenoj kupelji (5, 16, 20). Kako bi se osigurala cjelovitost uzorka, odmrznuti uzorak treba prije analize temeljito promiješati (23). Kao referentni postupak u studiji Lima-Olivera i suradnika navodi se lagano okretanje uzorka 6-puta iako postoje i druge mogućnosti. Stoga, glavna preporuka je da svaki laboratorij treba standardizirati postupak miješanja odmrznute plazme uporabom jedne tehnike. Međutim, nepotpuno odmrzavanje uzorka ili predugo stajanje na 37°C može rezultirati nepouzdanim rezultatima zbog aktivacije faktora zgrušavanja i narušene cjelovitosti uzorka (5, 24, 20).

Analitička faza rada pri izradi koagulacijskih pretraga

Načela, oprema i tehnika ispitivanja

U svrhu dobivanja točnih i pouzdanih rezultata koagulacijskih pretraga, ključno je odabrati prikladnu metodu njihovog određivanja. U laboratorijima su dostupni različiti komercijalni testovi koji se mogu podijeliti u tri glavne kategorije: koagulometrijski, kromogeni i imunokemijski testovi. Specifične informacije vezane uz načelo ispitivanja, opremu i tehnike koje se koriste u koagulacijskim laboratorijima opisane su u radu Mackie i suradnika i nisu sastavni dio ovih preporuka (25). Za evaluaciju, validaciju i primjenu koagulometara u svakodnevnoj praksi, laboratoriji bi trebali slijediti preporuke koje su objavili Gardiner i suradnici (26).

Kontrola kvalitete

Svrha kontrole kvalitete (KK) je osiguranje točnih rezultata pretraga. Sheme upravljanja unutarnjom (UKK) i vanjskom kontrolom kvalitete (VKK) trebaju biti sastavni dio svih koagulacijskih pretraga koje izrađuju dijagnostički laboratoriji. UKK osigurava pouzdanost rezultata i svodi varijacije unutar ili iz dana u dan na najmanju moguću mjeru, dok je glavni cilj VKK utvrditi točnost mjerenja (27, 28). UKK treba provoditi nakon otapanja svakog pojedinog reagensa, te nakon umjeravanja, preventivnog održavanja i servisa analizatora (27). Nadalje, svaki laboratorij treba definirati učestalost UKK ovisno o broju uzoraka i načinu na koji se uzorci obrađuju. Za kvantitativne testove, potrebno je koristiti najmanje dvije razine kontrolnog materijala, uključujući normalnu i patološku razinu, nakon svakih osam sati neprekidnog rada (29). Međutim, kod velikog radnog opterećenja, potrebno je učestalije provođenje UKK (27). Učestalost UKK može biti propisana i drugačije, ukoliko je laboratorij proveo analizu rizika prije same primjene. Za VKK još uvijek nema dokaza o optimalnoj učestalosti izvođenja, ali ona mora biti sastavni dio ukupnog sustava upravljanja kvalitetom u laboratoriju (2). VKK pruža informacije o učinkovitosti sustava upravljanja laboratorijima, a sudjelovanjem u programima VKK laboratoriji osiguravaju kvalitetu ispitivanja koja će omogućiti ispravnu dijagnozu i sigurnost bolesnika (2, 28).

Koagulacijske pretrage

Kako je pri odabiru prikladne metode određivanja koagulacijskih pretraga važno poznavati i njihove analitičke značajke (4) u daljnjem tekstu navedeni su najvažniji podaci o analitičkim značajkama pretraga PV-a, APTV-a, TV-a, fibrinogena i D-dimera.

Protrombinsko vrijeme

PV je najčešća probirna koagulacijska pretraga. Koristi se za praćenje terapije antagonistima vitamina K (engl. *vitamin K antagonists*; VKA) te za procjenu nasljednog ili stečenog manjka faktora zgrušavanja II (FII), V (FV), VII (FVII), X (FX) i fibrinogena te prisutnosti njihovih inhibitora (29). Svi komercijalni reagensi za PV (također poznati kao tromboplastini) sadrže tkivni faktor (engl. *Tissue Factor*, TF), fosfolipide i kalcijev klorid. Dostupni su različiti komercijalni pripravci tromboplastina koji mogu biti humanog ili životinjskog podrijetla ili rekombinantni. Rezultati PV-a značajno ovise o vrsti reagensa i instrumentu u uporabi te se stoga mogu razlikovati između laboratorija (4).

U svrhu standardizacije PV-a i praćenja terapije s VKA u različitim laboratorijima, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) uvela je sustav INR-a za izvještavanje rezultata PV-a (29-31). Za svaki serijski broj PV reagensa, proizvođači moraju odrediti i naznačiti specifičnu vrijednost ISI-ja koja odražava osjetljivost reagensa na faktore zgrušavanja ovisno o vitaminu K u odnosu na odgovarajući referentni standard WHO, tzv. međunarodni referentni pripravak (engl. *International Reference Preparation*, IRP). INR se dobiva računski, a predstavlja omjer vrijednosti PV-a u sekundama izmjenjenog kod bolesnika i srednjeg normalnog protrombinskog vremena (engl. *Mean Normal Prothrombin Time*; MNPV), uz eksponent ISI za odgovarajući PV reagens (31,32). MNPV predstavlja geometrijsku sredinu vrijednosti PV-a dobivenih od najmanje 20 zdravih dobrovoljaca. Iako je prihvatljivo koristiti tromboplastine s vrijednostima ISI-ja do 1,5 ili čak 1,7, preporučuje se upotreba tromboplastina s vrijednostima ISI-ja manjim od 1,2, zbog veće osjetljivosti na manjak faktora i veće preciznosti određivanja INR-a (29-33). Budući

da varijacije u vrijednostima mogu postojati i uslijed netočnog određivanja MNPV-a ili različite vrijednosti ISI-ja koja se primijenjuje u laboratoriju, INR određen s različitim tromboplastinima u uzorku plazme istog bolesnika nije uvijek istovjetan (31).

Kad god je to moguće, potrebno je koristiti vrijednost ISI-ja specifičnog za kombinaciju tromboplastina i koagulometra koji su u uporabi, čime se postiže veća točnost u određivanju INR-a u odnosu na uporabu generičkog ISI-ja (ISI određen za tromboplastin koji nije specifičan za određeni koagulometar već za skupinu koagulometara). Ako nije dostupna vrijednost ISI-ja za određenu kombinaciju tromboplastina i koagulometra, preporučuje se lokalno određivanje ISI-ja (29,30,32). Ukratko, to se može postići pomoću seta liofiliziranih uzoraka plazme s deklariranim vrijednostima PV-a, a koje su određene uporabom IRP-a i ručne tehnike. Uzorke plazme treba analizirati na lokalno-specifičnoj kombinaciji koagulometra i reagensa te dobivene vrijednosti grafički prikazati stavljanjem u odnos s deklariranim vrijednostima. Nagib pravca dobiven ortogonalnom regresijskom analizom koristi se za izračunavanje lokalnog ISI-ja prema jednadžbi: $ISI(\text{lokalni}) = \text{nagib pravca} \times ISI(\text{IRP})$. Za određivanje vrijednosti lokalnog ISI-ja također se mogu koristiti i liofilizirane kalibracijske plazme s poznatim vrijednostima INR-a (tvz. metoda direktnog INR-a). Uzorci plazme analiziraju se na specifičnoj kombinaciji koagulometra i reagensa, a izmjereno vrijeme zgrušavanja u sekundama se stavlja u odnos s naznačenim vrijednostima INR-a. Iz dobivene kalibracijske krivulje prema kojoj se vrijeme zgrušavanja uzorka plazme prevodi u INR dobije se specifična vrijednost ISI-ja. Za dodatne detalje čitatelji se upućuju na literaturne navode 29, 30 i 32.

Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

Pretraga APTV probirni je test koji se koristi u procjeni manjka faktora zgrušavanja VIII (FVIII), IX (FIX), XI (FXI) i XII (FXII) ili prisutnosti njihovih inhibitora. Svaki APTV reagens sadrži kontaktni aktivator (silicijev dioksid, kaolin, elaginsku kiselinu) ili kombinaciju aktivatora i fosfolipide, ali kako ne sadrži TF, naziva se "parcijalni tromboplastin". Faktori

zgrušavanja prisutni u uzorku ispitivane plazme "aktiviraju se" nakon dodatka APTV reagensa i kalcijevog klorida kao zasebnog reagensa na 37°C (29, 34).

Pretraga APTV se mjeri u sekundama, a rezultati pretrage značajno ovise o reagensu i koagulacijskom analizatoru koji su u uporabi. Zbog varijabilnosti u sastavu reagensa, tj. fosfolipida i aktivatora, pojedini se APTV reagensi znatno razlikuju prema osjetljivosti na faktore zgrušavanja, terapiji UFH-om i lupus antikoagulansu (LA) (4, 29, 34). Stoga je praćenje terapije UFH-om pomoću APTV-a vrlo teško standardizirati između različitih laboratorija (35). Opća preporuka je određivanje osjetljivosti pojedinih APTV reagensa na UFH te određivanja vlastitog terapijskog intervala za svaki novi serijski broj reagensa, vrstu reagensa ili koagulometar (35-37).

Terapijski raspon za praćenje terapije UFH-om određuje se na način da odgovara rasponu od 0,3 do 0,7 anti-Xa kIU/L. U ovu svrhu, potrebno je prikupiti uzorke krvi 50 bolesnika koji su na kontinuiranoj intravenskoj terapiji UFH-om, uzorkovanih najmanje 4-6 sati nakon bolusa heparina, ali i manje od 24 sata nakon primjene prve doze VKA. Uzorci krvi trebaju biti obrađeni prema standardnom postupku, poželjno je da su dvaputa centrifugirani, a plazma se do izvođenja analize treba zamrznuti na -35°C ili na nižoj temperaturi. Plazma se odmrzava na 37°C tijekom 5 minuta, te se odrede APTV i aktivnost heparina anti-Xa testom. Odnos između vrijednosti APTV-a na osi Y i heparinana osi X, prikazuje se regresijom analizom (35-37).

Za razliku od UFH-a, niskomolekularni heparin (engl., *low molecular weight heparin*; LMWH), koji je zamijenio primjenu UFH-a u većini kliničkih situacija, ne zahtijeva rutinsko laboratorijsko praćenje. Izuzetak su neka klinička stanja i/ili populacije bolesnika u kojima je potrebno praćenje terapije s LMWH, uključujući bolesnike sa zatajenjem bubrega, pretile bolesnike, djecu i trudnice te bilo kojeg bolesnika kod kojeg se ne postigne očekivani antikoagulacijski učinak. S obzirom kako LMWH-i imaju pretežno anti-Xa aktivnost i ne pokazuju odgovarajući utjecaj na APTV (38), za praćenje terapije s LMWH ne bi se trebao

koristiti APTV, već je za procjenu terapijskog odgovora u ovom slučaju prikladna pretraga određivanje anti-Xa aktivnosti (38).

Trombinsko vrijeme

TV je probirna koagulacijska pretraga koja se koristi za procjenu manjka ili kvalitativnih poremećaja fibrinogena te prisutnosti inhibitora trombina [aktiviranog FII (FIIa)] (39, 40). Procjenjuje sposobnost pretvorbe fibrinogena u fibrin nakon dodavanja goveđeg ili ljudskog trombina u suvišku uzorku PPP-a, a mjeri se u sekundama. Test je osjetljiv na inhibitore trombina koji mogu biti prisutni u plazmi (npr. heparin i dabigatran), a može otkriti i kontaminaciju uzorka heparinom čak i pri vrlo niskim koncentracijama heparina (>0.05 anti-Xa kIU/L). Međutim, zbog preosjetljivosti na inhibitore trombina (heparin, dabigatran), test nije prikladan za praćenje antikoagulacijske terapije heparinom i dabigatranom, te nije standardiziran za tu svrhu (40).

Fibrinogen

U većini slučajeva, fibrinogen uz pretrage PV i APTV služi kao dio općeg probira u ispitivanju poremećaja hemostaze (41, 42). Za mjerenje količine fibrinogena u plazmi postoji nekoliko vrsta testova, među kojima se najčešće koristi test određivanja funkcionalne aktivnosti fibrinogena temeljen na Claussovoj metodi (42). Načelo Claussove metode sastoji se u dodatku visoke koncentracije trombina razrijeđenoj plazmi ispitanika i određivanju vremena zgrušavanja plazme u sekundama. Budući da se rezultat izražava u g/L, test zahtijeva kalibraciju pomoću referentne plazme poznate koncentracije fibrinogena kalibrirane prema međunarodnom standardu. Naznačene i izmjerene vrijednosti fibrinogena stavljaju se u odnos kako bi se dobila kalibracijska krivulja u širokom rasponu koncentracija fibrinogena (42,43). Iako kombinacija reagensa i koagulometra ima minimalni učinak na određivanje fibrinogena Claussovom metodom, u određenim podskupinama bolesnika (npr. diseminirana intravaskularna koagulacija; DIK) ili trombolitička terapija), različita koncentracija trombina ili različit pufer u sastavu reagensa

mogu utjecati na razlike u rezultatu (42). Funkcionalni test fibrinogena se općenito smatra najboljom metodom za široku primjenu u laboratorijima (42).

Imunokemijski testovi kao što su enzim-imunokemijska metoda na krutom nosaču (engl. *Enzyme Linked Immunosorbentassay*, ELISA) i imunonefelometrija mjere koncentraciju antigena fibrinogena, a ne njegovu funkcionalnu aktivnost (5). Uglavnom se upotrebljavaju u diferencijalnoj dijagnostici disfibrinogenemije koja se temelji na razlici rezultata dobivenog mjerenjem funkcionalne aktivnosti i koncentracije antigena fibrinogena. Ovi testovi se ne primjenjuju često u praksi (42).

Metoda određivanja deriviranog fibrinogena omogućuje procjenu fibrinogena iz reakcijske krivulje za PV na automatiziranim optičkim koagulometrima. PV se određuje promjenom optičke gustoće za određeni raspon razrjeđenja u plazmi s poznatim koncentracijama fibrinogena, a optička promjena za različite vrijednosti fibrinogena prikazana je kao kalibracijska krivulja. Međutim, literaturni podaci koji se odnose na procjenu prikladnosti metode za kliničku primjenu su proturječni (44, 45). Stoga, iako je metoda jednostavna i jeftina, kod određenih poremećaja i kliničkih stanja može rezultirati netočnim i nepouzdanim rezultatom, zbog čega se ne preporučuje za rutinsku laboratorijsku primjenu (42).

D-dimer

Za mjerenje koncentracije D-dimera dostupni su različiti kvalitativni (rezultat se izražava kao pozitivan ili negativan), polukvantitativni i kvantitativni testovi, poput ELISA-e ili lateks-imunokemijskih testova (engl. *Latex Immunoassay*, LIA) koji koriste monoklonska antitijela specifična za različite epitope D-dimera (46,47). Glavni problem vezan uz određivanje D-dimera je taj što različiti komercijalni testovi za D-dimere nisu standardizirani, obzirom da se u metodama često upotrebljavaju različita monoklonska antitijela i kalibratori (46-49). Kako do sada još uvijek nije dostupan standardni referentni pripravak (tj. međunarodni standard), mjerne jedinice još uvijek nisu standardizirane, pa se rezultati, referentni

intervali i granične vrijednosti na kojima se temelji klinička odluka ne mogu ekstrapolirati između metoda. Stoga se rezultati D-dimera moraju pažljivo tumačiti ovisno o metodi koja se koristi za njihovo određivanje (48-50).

Poslijeanalitička faza rada pri izradi koagulacijskih pretraga

Referentni intervali, granične vrijednosti i usklađivanje izvještavanja o rezultatima

Rezultati većine koagulacijskih pretraga, kao i referentni intervali koji se primjenjuju značajno ovise o kombinaciji reagensa i koagulacijskog analizatora u upotrebi. Stoga, rezultati koagulacijskih pretraga za istog bolesnika dobiveni u različitim laboratorijima mogu biti neusporedivi. Opća preporuka za svaki laboratorij je određivanje vlastitih referentnih intervala na lokalnoj populaciji. Međutim, kako je ovu preporuku teško primijeniti u svakodnevnoj praksi, većina laboratorija koristi referentne intervale koji su preuzeti od strane proizvođača ili su dostupni u literaturi (25, 51-53). Ukoliko se referentni intervali preuzimaju od proizvođača ili iz literature, preporučuje se njihova prethodna verifikacija. Kako bi se provjerilo da li su preuzete vrijednosti referentnog intervala prikladne za lokalnu populaciju, koristi se uzorak od minimalno 20 do 40 zdravih ispitanika, pri čemu vrijednosti za određenu pretragu trebaju biti ravnomjerno raspoređene u cijelom preporučenom referentnom intervalu. Ako se 95% rezultata nalazi u rasponu objavljenog referentnog intervala, on se može prihvatiti za upotrebu. Međutim, puna statistička validacija može zahtijevati 120 ili više uzoraka (25,53). Za neke analite, kao što su D-dimeri, prikladnije je utvrditi granične vrijednosti zasnovane na kliničkim podacima (25,48). Korištenje referentnih intervala prilagođenih prema dobi ključno je kako bi se osiguralo pravilno liječenje djece s poremećajima hemostaze. Međutim, objavljeni referentni intervali prema dobnim skupinama nisu dostupni za većinu reagensa koji se trenutno koriste u praksi. Opća preporuka SSC-a ISTH-a za laboratorije koji analiziraju pedijatrijske uzorke je definiranje vlastitih referentnih intervala ovisno o dobnim skupinama, koagulometru i reagensu u upotrebi (54). Dakako, laboratoriji koji nisu u mogućnosti odrediti vlastite

pedijatrijske referentne intervale trebaju se pridržavati objavljenih referentnih intervala prilagođenih dobnoj skupini, a koji su utvrđeni u istovjetnim tehničkim uvjetima.

Izveštavanje rezultata za svaku probirnu koagulacijsku pretragu kao i za D-dimere, opisano je u daljnjem tekstu.

PV/INR

PV se mjeri u sekundama, dok se koagulabilnost krvi obično izražava kao "postotak aktivnosti od normalne vrijednosti". Kod odrasle osobe koja ne prima VKA vrijednost PV-a je >70%. Vrijednost manja od 70% ukazuje na vrijeme zgrušavanja dulje od normalnog i upućuje na hipoagulabilnost krvi (29,51). Ako se PV određuje zbog praćenja terapije s VKA, za izveštavanje rezultata potrebno je koristiti isključivo INR (30). WHO je razvio sustav INR-a u svrhu poboljšanja usporedivosti rezultata PV-a dobivenih u različitim laboratorijima, smanjujući razliku između svih komercijalnih reagensa primjenom metode kalibracije prema IRP-u WHO-a. Općenito, predloženi terapijski interval za INR iznosi od 2,0 do 3,0 za većinu kliničkih indikacija, iako za bolesnike s mehaničkim srčanim zaliscima terapijski interval INR-a može biti nešto veći tj. od 2,0 do 3,5 (30,33). Vrijednosti INR-a iznad preporučenog terapijskog intervala ukazuju na povećani rizik od krvarenja, dok su vrijednosti ispod terapijskog intervala povezane s povećanim rizikom za trombozu. Važno je napomenuti da vrijednost INR-a treba uvijek biti izražena kao brojčana vrijednost do određene kritične vrijednosti, a ovisno o dobivenoj kalibracijskoj krivulji za određeni serijski broj reagensa. Nažalost iako značajno smanjuje varijacije i pruža klinički korisne informacije niti INR kao mjerna jedinica nije savršen način izveštavanja u smislu usporedivosti rezultata među laboratorijima (29, 30). Treba naglasiti kako se rezultati PV-a trebaju izveštavati kao INR samo za bolesnike na terapiji s VKA, dok se u svim ostalim kliničkim indikacijama određivanja PV-a, INR ne smije izveštavati. Rezultati PV-a izraženog kao omjer nisu prikladni za pouzdano prilagođavanje doze kod bolesnika na terapiji s VKA. Međutim, neki autori smatraju da u određenim stanjima kao što su npr.

kronične bolesti jetre ili DIK izvještavanje rezultata kao omjer PV-a može biti informativno te da bi ga na nalazu trebao izdavati uz postotak (33,55).

Preduvjet za pravilno izvještavanje o rezultatima PV-a je odgovarajuća informacija o kliničkom stanju bolesnika na uputnici. Razumijevanje važnosti izražavanja rezultata pretrage na različit način u pojedinim kliničkim stanjima može imati izravan utjecaj na praćenje liječenja bolesnika.

APTV

APTV se mjeri u i izvještava sekundama. Ispravno tumačenje rezultata APTV-a zahtijeva razumijevanje kliničkog konteksta u kojem se provodi ispitivanje, kao i ograničenja samog testa (29, 34). Budući da se APTV reagensi razlikuju prema svojoj osjetljivosti na manjak faktora zgrušavanja, UFH i LA (29, 34-37), izvještavanje APTV-a isključivo u sekundama može rezultirati neodgovarajućom usporedivošću rezultata među laboratorijima, budući da se i referentni interval i rezultat testa razlikuju za određene kombinacije reagensa i koagulometra. Stoga, na nalazu koagulacijskih pretraga, uz rezultat izražen u sekundama, uvijek treba izvijestiti i omjer APTV-a. Omjer APTV-a se izračunava kao omjer bolesnikovog APTV-a podijeljen sa srednjom vrijednošću referentnog intervala za određeni sustav reagens/koagulometar (51). Ukoliko laboratorij nije u mogućnosti odrediti vlastiti referentni interval za APTV izražen u sekundama, potrebno je slijediti preporuku proizvođača, dok je referentni interval za omjer APTV-a uvijek u rasponu od 0,8 do 1,2, neovisno o sustavu reagens/koagulometar.

TV

Pretraga TV ima malu dijagnostičku vrijednost i rezultat ove pretrage treba tumačiti zajedno s rezultatima općih probirnih pretraga, uključujući PV, APTV i fibrinogen. TV se mjeri i izvještava u sekundama. Referentni intervali još uvijek nisu harmonizirani i značajno ovise o kombinaciji reagensa (tj. koncentraciji trombina u TV reagensu) i koagulometra koji

su u upotrebi (39, 40). Stoga, ukoliko laboratorij nije u mogućnosti odrediti vlastiti referentni interval treba slijediti preporuke proizvođača.

Fibrinogen

Test funkcionalne aktivnosti fibrinogena mjeri njegovu sposobnost pretvorbe u fibrin. Kao što je već spomenuto, rezultati dobiveni u sekundama se pomoću kalibracijske krivulje prevode i izražavaju u g/L. Referentni interval za fibrinogen je općenito između 1,8-4,0 g/L u zdravih odraslih osoba, ali može biti različit za različite komercijalne testove fibrinogena (42). Nedavno istraživanje među laboratorijima u RH pokazalo je da laboratoriji koriste referentni interval prema dokumentu o harmonizaciji koji je objavila HKMB tijekom 2005. godine (6, 33). Međutim, kako se taj referentni interval temelji na rezultatima dobivenim u spremnicima s 3,8% citratom, potrebno ga je revidirati. Za sada, glavna preporuka za laboratorije je određivanje vlastitih referentnih intervala, a ukoliko to nije moguće treba slijediti preporuke proizvođača.

D-dimeri

Različite metode određivanja D-dimera koriste monoklonska antitijela različite specifičnosti, različite mjerne jedinice i granične vrijednosti. Stoga, rezultate dobivene različitim metodama nije moguće usporediti (46,47,50). Načelno, rezultati pretrage D-dimera, izraženi u jedinicama ekvivalentnim fibrinogenu (engl. *Fibrinogen equivalent units*; FEU) približno su dva puta veći od rezultata izraženih u jedinicama D-dimera (engl. *D-dimer units*, DDU), tj. 1,0 mg/L FEU otprilike odgovara 0,5 mg/L DDU. Dogovor o poželjnoj jedinici izvještavanja još uvijek nije postignut. Drugi problem koji se susreće u svakodnevnoj praksi odnosi se na upute za rad za neke testove prisutne na tržištu, a koji ne pružaju informaciju o vrsti jedinice koja se u testu koristi. Stoga se upotreba takvih testova ne preporučuje. Nadalje, postoje i značajne razlike u izvještavanju D-dimera koje se odnosi na mjerne jedinice, kao što su mg/L ili µg/L, za različite komercijalne testove, što može i izazvati pogrešno tumačenje nalaza (46,47). Budući da se rezultati različitih

metoda za D-dimere ne mogu uspoređivati, laboratoriji bi uz rezultat na nalazu trebali navesti metodu koju upotrebljavaju zajedno s odgovarajućom vrstom jedinice, dakle DDU ili FEU. S obzirom na mjerne jedinice rezultati trebaju biti izraženi kao mg/L DDU ili FEU.

Opća preporuka za svaki laboratorij je da za se za vlastitu metodu određivanja D-dimera odredi granična vrijednost na kojoj se temelji klinička odluka. (48). Međutim, budući da je za gotovo sve laboratorije ovaj uvjet vrlo teško ispuniti, odabir granične vrijednosti uglavnom se temelji na vrijednostima koje deklarira proizvođač. Stoga se preporučuje klinička validacija tako preuzete granične vrijednosti. Treba naglasiti da granične vrijednosti za D-dimere imaju visoku negativnu prediktivnu vrijednost, pa je glavna vrijednost pretrage odsutnost povišenih vrijednosti D-dimera.

Interpretativni komentari

Nedavno provedena anketa među među dijagnostičkim laboratorijima u RH pokazala je kako samo mali broj laboratorija na nalazu koagulacijskih pretraga dodatno interpretira rezultate ili daje preporuke za daljnja ispitivanja (6). U današnje vrijeme, kao sastavni dio laboratorijske usluge, sve se više potiče davanje interpretativnih i/ili informativnih komentara vezanih uz interferencije i nalaze za pojedine uzorke bolesnika (56). Interpretativni i/ili informativni komentari u izvješću o rezultatima mogu pomoći kliničaru da na odgovarajući način upotrijebi laboratorijske podatke. Stoga, u svrhu sprječavanja ili smanjenja pogrešaka i poboljšanja ishoda za bolesnika, preporučuje se uvođenje odgovarajućih interpretativnih komentara vezanih za prijeanalitičku i analitičku fazu ispitivanja, kao i onih vezanih uz proširenje prvotnog kliničkog zahtjeva kad god je to opravdano.

Kritične vrijednosti

Kritični rezultati su vrijednosti koje predstavljaju patofiziološko stanje pri kojem je promjena u usporedbi s normalnim (očekivanim vrijednostima) ili prethodno dobivenim vrijednostima

po život opasna i za koje treba odmah poduzeti korektivne mjere. U hemostazi, to bi značilo rizik od teških krvarenja ili tromboze (57).

Općenito se kritične vrijednosti za PV, APTV i fibrinogen razlikuju u različitim zemljama i još uvijek nisu standardizirane. U kliničkoj praksi, vrijednost INR-a $>5,0$ smatra se klinički značajnom jer zahtijeva hitnu intervenciju kako bi se smanjio antikoagulacijski učinak VKA (npr. ukidanje doze) i spriječio rizik od krvarenja (npr. primjena vitamina K, svježe smrznute plazme ili protrombinskog kompleksa) (59). Prilikom određivanja kritične vrijednosti za APTV, laboratoriji trebaju uzeti u obzir rezultate APTV-a specifične za njihovu kombinaciju reagensa i koagulometra prema prethodno opisanom postupku (59). Općenito, terapijski interval za omjer APTV-a trebao bi biti 1,5 do 2,5 puta veći od gornje granice referentnog intervala, a bilo koji omjer veći od toga može ukazivati na povećani rizik od krvarenja i zahtijeva hitnu intervenciju (npr. prilagođavanje intravenske doze heparina) (57). Stoga takvu vrijednost treba izvjestiti kliničaru, budući da još uvijek nema dogovora oko odgovarajuće kritične vrijednosti. Nadalje, vrijednost fibrinogena manja od 0,8 g/L također ukazuje na povećani rizik od krvarenja i treba je odmah izvjestiti kliničaru (57, 59). U nedostatku općeprihvaćenih preporuka, laboratoriji se potiču da na lokalnoj razini definiraju klinički značajne kritične vrijednosti i/ili prošire postojeći popis kritičnih vrijednosti u suradnji s liječnicima (57). Međutim, pravila za izvještavanje kritičnih vrijednosti mogu biti različita za uzorke koje su u laboratorij došli po prvi put u odnosu na slijedeća uzorkovanja kod istog bolesnika. Stoga je važno naglasiti kako izvještavanje o kritičnoj vrijednosti u svakoj ustanovi treba biti rezultat zajedničkog rada između laboratorijskih i kliničkih djelatnika (60).

Sažetak

Nedavno provedeno istraživanje među dijagnostičkim laboratorijima u RH pokazalo je različit način postupanja u svakodnevnoj praksi u pojedinoj fazi izrade koagulacijskih pretraga (5). To nije iznenađujuće obzirom da laboratoriji rade na različitim razinama

zdravstvene zaštite i pod okriljem različitih profesionalnih društava. Stoga je cilj ovog rada bio sažeti osnovne preporuke za postupke u prijeanalitičkoj, analitičkoj i poslijeanalitičkoj fazi izrade najčešće izvođenih koagulacijskih pretraga. Međutim, među laboratorijima s malim i velikim brojem uzoraka postoje razlike u tehnološkim rješenjima. Koagulacijske pretrage se sve više integriraju u velike automatizirane laboratorijske sustave u svrhu poboljšanja kvalitete, učinkovitosti i brige o bolesnicima, uz istodobno smanjenje troškova, iako se načelo analiza ne mjenja. Neovisno o broju pretraga ili integraciji, laboratorijska dijagnostika poremećaja sustava hemostaze zahtjeva specifične vještine (61). Tumačenje i upotreba dobivenih informacija na odgovarajući način od presudne je važnosti, kao i prepoznavanje potencijalnih izvora pogrešaka u cijelokupnom procesu laboratorijskog rada. Stoga, smatramo da će ove preporuke biti korisne u svakodnevnoj praksi laboratorija koji izvode probirne koagulacijske pretrage i D-dimere. Kako se prikupljene informacije temelje na prethodno objavljenim smjernicama, izvješćima stručnih odbora ili stručnom mišljenju, snaga dokaza nije toliko izražena. Ipak, smatramo ove preporuke važnim iskorakom prema standardizaciji postupaka i dobivanju usporedivih rezultata pretraga među dijagnostičkim laboratorijima u RH.

Literatura

1. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 2013;93:327–58.
2. Bonar R, Favaloro EJ, Adcock DM. Quality in coagulation and haemostasis testing. *Biochem Med* 2010;20:184-99.
3. Harris NS, Bazydlo LAL, Winter WE. A Primer on Haemostasis for Clinical Chemists. *Clinical Laboratory News* 2012. Source:<https://www.aacc.org/publications/cln/articles2012/January/coagulation-tests>. Accessed March 17th 2016

4. Chandler WL. Initial evaluation of hemostasis: reagent and method selection. U: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Second Edition. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str.63-71.
5. Favaloro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in haemostasis. Lab Med 2012;43:1-10.
6. 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 2017;27:199-216.
7. Lippi G, Favaloro EJ. Causes of errors in medical laboratories. U Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Second Edition.. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str. 22-31.
8. 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.
9. Lippi G, Favaloro EJ. Preanalytical Issues in Hemostasis and Thrombosis Testing. Methods Mol Biol 2017;1646:29-42.
10. 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 2013;23:242-54.
11. 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, PA; Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.
12. Adcock D, Kressin DC, Marlar RA. Minimum Specimen Volume Requirements for Routine Coagulation Testing Dependence on Citrate Concentration. Am J Clin Pathol 1998;109:595-9.
13. Bennett ST. Collection of Coagulation Specimens. U: Bennett ST, Lehman CM, Rodgers GM, ur. Laboratory Hemostasis - A Practical Guide for Pathologists. Springer International Publishing Switzerland; 2015. str.19-32.

14. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality Standards for Sample Collection in Coagulation Testing. *Sem Thromb Haemost* 2012;38:565-75.
15. Laxson CJ, Titler MG. Drawing coagulation studies from arterial lines; an integrative literature review. *Am J Critical Care* 1994;1:16-24.
16. Adcock Funk D. Sample integrity and preanalytical variables. U: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Second Edition..* Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str. 45-56.
17. 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.
18. 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.
19. Lippi G, Plebani M, Favarolo EJ. Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *SeminThrombHemost* 2013;39:258–66.
20. 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.
21. Van Geest-Daalderop JHH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJM, Hoekstra MMCL, van den Besselaar AMH. 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.
22. 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.
23. 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.

24. 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.
25. 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.
26. Gardiner C, Kitchen S, Dauer RJ, Kottke-Marchant K, Adcock DM. Recommendations for evaluation of coagulation analyzers. *Laboratory Hematology: Official Publication of the International Society for Laboratory Hematology* 2006;12:32–8.
27. Kitchen S, Preston EF, Olson JD. Internal Quality Control in the Hemostasis Laboratory. U: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Second Edition*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str.57-64.
28. Preston EF, Kitchen S, Srivastava A. External Quality Assessment in Hemostasis: Its Importance and Significance. U: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Second Edition*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str.65-76.
29. CLSI. One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline—Second Edition H47-A2, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2008.
30. Tripodi A. Monitoring Oral Anticoagulant Therapy. U: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Second Edition*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str. 253-63.
31. Bonar R, Favalaro EJ. Explaining and reducing the variation in inter-laboratory reported values for International Normalised Ratio. *Thromb Res* 2017;150:22-9.
32. Adcock DM, Brien WF, Duff SL, Johnston M, Kitchen S, Marlar RA, Ng VL, van den Besselaar T, Woodhams BJ. Procedures for Validation of INR and Local Calibration of PT/INR Systems; Approved Guideline. CLSI guideline H54-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
33. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije. Dostupno na: <http://www.hkmb.hr/obavijesti/obavijesti-index.html>. Pristupljeno: 21. ozujka, 2016.

34. Lippi G, Favaloro EJ. Activated partial thromboplastin time: New tricks for an old dogma. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:604–11.
35. Johnston M. Monitoring Heparin Therapy. U: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, Second Edition*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str. 224-52.
36. Brill-Edwards P, Gunsberg JS, Johnston M, Hirsh J. Establishing a therapeutic range for heparin therapy. *Ann Intern Med* 1993;119:104-9.
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.
38. Laposata M, Green D, Van Cott EM, Barrowcliffe TW, Goodnight 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. Hemostasis Screening Assays. U: Bennett ST, Lehman CM, Rodgers GM, ur. *Laboratory Hemostasis: A Practical Guide for Pathologists*. Springer International Publishing Switzerland ; 2007. str. 85-101.
40. Teruya J. Thrombin Time. <http://emedicine.medscape.com/article/2086278-overview>. Pristupljeno: Ozujak 2016.
41. Ariens RAS. Fibrin(ogen) and thrombotic disease. *J Thromb Haemost* 2013;11:294–305.
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.
43. Van den Besselaar AMHP, van Rijn CJJ, Cobbaert CM, Reijnierse 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.

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;126:428-33.
45. Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inaccuracy of the „derived“ fibrinogen measurement. *Blood Coagul Fibrinol* 1994;5:955-7.
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.
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.
48. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quantitative D-Dimer for the Exclusion of Venous Thromboembolic Disease; Approved Guideline H59–A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2011.
49. Elferink RFM, Loot 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.
50. Douma RA, Tan M, Schutgens RE, Bates SM, Perrier A, Legnani C i sur. 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.
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.
52. Marlar RA. Hemostasis test validation, performance, and reference intervals: international recommendations and guidelines. U: Kitchen S, Olson JD and Preston FE, ur. *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*, Second Edition. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013. str.13-21.
53. Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hematol* 2017; 39:121-27.
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.

55. Tripodi A, Lippi G, Plebani M. How to report results of prothrombin and activated partial thromboplastin times. *Clin Chem Lab Med* 2015;54:215-22.

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.

57. Lippi G, Adcock D, Simundic AM, Tripodi A, Favaloro EJ. Critical laboratory values in hemostasis: toward consensus. *Ann Med* 2017;49:455-461.

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.

59. Pal 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.

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.

61. Huber AR; Méndez A; Brunner-Agten S: Automation in haemostasis. *Hämostaseologie* 2013;4:295-8.

Tablica 1. Osnovne preporuke za postupke u prijeanalitičkoj analitičkoj i poslijeanalitičkoj fazi izrade probirnih koagulacijskih pretraga PV, APTV, TV, fibrinogen i D-dimeri

Preporuka broj:	Opis preporuke	Literatura
<u>Prijeanalitička faza rada pri izradi koagulacijskih pretraga</u>		
Zahtjev za pretragama - uputnica		
Preporuka 1	Informacije o radnoj ili potvrđenoj dijagnozi, kao i podatak o antikoagulacijskoj terapiji trebaju biti sastavni dio zahtjeva za pretragama.	10
Priprema i identifikacija bolesnika		
Preporuka 2	Priprema i identifikacija bolesnika prije uzorkovanja krvi mora se provesti sukladno Nacionalnim preporukama za uzimanje venskih uzoraka.	10
Spremnici za uzorkovanje i antikoagulans		
Preporuka 3	Uzorci venske krvi za koagulacijske pretrage uzimaju se u staklene ili plastične spremnike s neaktivirajućom površinom.	11,13
Preporuka 4	Spremnici za koagulaciju trebaju sadržavati puferirani trinatrijev citrat kao antikoagulans u koncentraciji od 105-109 mmol/L, tj. 3.2%-tni trinatrijev citrat.	11

Preporuka 5	Omjer krvi i antikoagulansa u spremniku za koagulacijske pretrage treba biti 9:1. Uzorci s volumenom krvi +/-10% u odnosu na količinu naznačenu na spremniku prihvatljivi su za analizu.	11, 12-14
Uzorkovanje krvi		
Preporuka 6	Uzorkovanje krvi za koagulacijske pretrage mora se provesti sukladno Nacionalnim preporukama za uzimanje venskih uzoraka.	10
Preporuka 7	<p>Prije uzorkovanja krvi putem intravenskih katetera, preporučuje se ispiranje katetera fiziološkom otopinom i odbacivanje prvih 5 ml krvi ili šesterostrukog volumena katetera.</p> <p>Prije uzorkovanja krvi u spremnike za koagulaciju iz zatvorenog venskog sustava, preporučuje se odbacivanje dva volumena katetera.</p>	8, 10,11
Preporuka 8	Ukoliko se uzorci za koagulacijske pretrage uzorkuju putem intravenskog katetera informacija o načinu uzorkovanja treba biti navedena na uputnici i nalazu.	
Redoslijed uzorkovanja spremnika		
Preporuka 9	Spremnik za koagulacijske pretrage treba uzorkovati prije bilo kojeg drugog spremnika s aditivom (aktivatorom zgrušavanja ili antikoagulansom).	10, 11, 14
Preporuka 10	Prije prikupljanja uzoraka venske krvi za probirne koagulacijske pretrage i D-dimere nije potrebno	10, 11, 14

	<p>uzorkovati spremnik koji se odbacuje.</p> <p>Izuzetak od ovog pravila uključuje postupak kada se koriste leptirići za uzorkovanje, budući da zrak u sustavu za vađenje može utjecati na punjenje spremnika a time i na omjer krvi i antikoagulansa u spremniku. Spremnik koji se odbacuje u ovom slučaju mora biti bez aditiva.</p>	
Neprihvatanje uzoraka		
Preporuka 11	Svaki laboratorij treba imati definirane kriterije za neprihvatanje koagulacijskih uzoraka.	11
Priprema uzoraka krvi za analizu		
Preporuka 12	Plazmu siromašnu trombocitima koja sadrži $<10 \times 10^9/L$ trombocita treba pripremiti centrifugiranjem uzoraka krvi na 1500g na sobnoj temperaturi (18-25°C) tijekom najmanje 15 minuta.	11,13,17
Preporuka 13	Ukoliko se u laboratoriju koristiti centrifuga s hlađenjem, centrifugiranje treba izvoditi na sobnoj temperaturi. Centrifuge bez hlađenja nisu prikladne ukoliko se pregrijavaju. Centrifugiranje s upotrebom funkcije kočenja potrebno je izbjegavati.	11,17
Preporuka 14	Za sve uzorke plazme koji se zamrzavaju do trenutka izvođenja analize potrebno je prije zamrzavanja provesti dvostruko centrifugiranje.	16,17
Uzorci s visokim		

vrijednostima hematokrita		
Preporuka 15	U uzorcima za određivanje koagulacijskih pretraga s vrijednostima hematokrita iznad 0,55 L/L, potrebno je prilagoditi konačnu koncentracija citrata u spremniku kako bi se održao odgovarajući omjer krvi i antikoagulansa od 9:1.	11,13,18
Preporuka 16	Postupak korekcije količine citrata 1. Izračun ostatnog volumena citrata u spremniku primjenom slijedeće jednadžbe: $C(\text{mL}) = 0.185^* \times [\text{volumen krvi (mL)}]** \times [1.0 - \text{Hct (L/L)}]$ C = ostatni volumen citrata u mL (volumen citrata koji ostaje u spremniku) *0,185 =konstanta **volumen krvi u mL, ovisno o volumenu upotrebljenog spremnika Hct = bolesnikov hematokrit (L/L) 2. Ostatni volumen citrata u mL treba oduzeti od ukupnog volumena citrata u spremniku, pri čemu se kao rezultat dobije volumen citrata koji treba ukloniti iz spremnika. 3. Izračunata količina citrata iz spremnika za koagulaciju se uklanja po mogućnosti upotrebom	11,18

	tuberkulinske štrcaljke kako bi se u spremniku održao podtlak. Ukoliko tuberkulinska štrcaljka nije dostupna mogu se koristiti i automatske pipete na način da se sa spremnika ručno ukloni čep, a ostatna količina citrata ukloni se pipetom. Uzorak krvi se dodaje do oznake na spremniku, a spremnik ručno začepi i dobro promiješa. Daljnje rukovanje isto je kao i sa svim ostalim koagulacijskim uzorcima.	
Preporuka 17	Za uzorke u kojima je potrebno prilagoditi volumen citrata na nalazu treba uvijek naznačiti da je volumen citrata u spremniku korigiran zbog visoke vrijednosti hematokrita.	11,18
Hemoliza, hiperbilirubinemija, lipemija		
Preporuka 18	Prihvatljivu koncentraciju interferirajućih tvari moguće je lokalno odrediti ukoliko su laboratoriji opremljeni novijom generacijom koagulacijskih analizatora, koji mjere optičku apsorpciju na različitim valnim duljinama.	19,20
Preporuka 19	Ukoliko se sumnja na intravaskularnu, odnosno hemolizu <i>in vivo</i> , rezultati ispitivanja trebaju biti izdani s odgovarajućim komentarom na nalazu (intravaskularna hemoliza) uz pojednosti o ograničenoj pouzdanosti rezultata ispitivanja.	11,19,20

Preporuka 20	Mehanička i/ili elektromehanička metoda detekcije ugruška preporučuje se kada god je to moguće, za analizu uzoraka koji sadrže supstance koje interferiraju uslijed spektralnog preklapanja.	11
Pohrana uzoraka do analize		
Preporuka 21	Uzorci za koagulacijske pretrage pohranjuju se do analize na sobnoj temperaturi (18-25°C) u neotvorenom spremniku	16, 20, 22
Preporuka 22	Sve koagulacijske pretrage potrebno je provesti unutar 4 sata od uzorkovanja.	11,20
Preporuka 23	Izuzetak od preporuke 22 mogu biti pretrage PV* i D-dimeri, za koje se uzorci mogu pohraniti na sobnoj temperaturi ne-centrifugirani ili centrifugirani i do 24 sata od uzorkovanja. Laboratoriji koji prihvaćaju za analizu uzorke za PV* i D-dimere pohranjene unutar 24 sata od prikupljanja krvi, trebaju potvrditi stabilnost uzorka na vlastitom sustavu.	21
Preporuka 24	Ukoliko se pretraga APTV† određuje u svrhu praćenja terapije nefrakcioniranim heparinom (UFH)** uzorke treba centrifugirati, a plazmu odvojiti od stanica unutar 1 sata od uzorkovanja.	11,16,21.
Preporuka 25	Ukoliko koagulacijske pretrage nije moguće izraditi unutar vremena dozvoljenog za analizu, plazmu treba centrifugirati, odvojiti od stanica i odmah zamrznuti (poželjno unutar jednog sata od uzorkovanja) na	16,20

	temperaturi od -20°C ili nižoj za kratkotrajnu pohranu (do dva tjedna) odnosno na temperaturi od -70°C za pohranu do šest mjeseci.	
Transport uzoraka na udaljene lokacije		
Preporuka 26	Uzorke za koagulacijske pretrage koji se na analizu šalju u udaljene laboratorije, potrebno je dostaviti u odgovarajućem vremenskom roku, poštujući vrijeme dozvoljeno za analizu pojedine tražene pretrage.	16,20
Preporuka 27	Ukoliko uzorke za koagulacijske pretrage nije moguće pravovremeno dostaviti u laboratorij za analizu, s uzorcima je potrebno postupiti kao što je to opisano u preporuci 25.	16,20
Preporuka 28	Svaki spremnik s uzorkom koji se šalje na analizu u udaljene laboratorije treba biti označen punim imenom i prezimenom bolesnika, datumom rođenja i identifikacijskim brojem. Uz to, treba navesti informaciju o vrsti uzorka (npr. citratna plazma), datumu i vremenu uzorkovanja.	16,20
Preporuka 29	Uzorci zamrznute plazme trebaju se transportirati na suhom ledu, a ukoliko to nije moguće, na dovoljnoj količini običnog leda u spremniku od stiropora, kako bi ostali čvrsto zamrznuti dok ne stignu u laboratorij za analizu.	16,20
Odmrzavanje zamrznutih uzoraka plazme		

Preporuka 30	Odmrzavanje zamrznutih uzoraka plazme treba provesti brzo, tijekom 5-10 minuta na 37°C u inkubatoru, suhom termo bloku ili vodenoj kupelji.	5,16,20,23
Preporuka 31	Kako bi se osigurala cjelovitost uzorka, odmrznuti uzorak prije analize treba temeljito promiješati. Prema literaturi referentni postupak je lagano okretanje uzorka 6-puta iako postoje i druge mogućnosti. Stoga je glavna preporuka za laboratorije standardizacija postupka miješanja odmrznute plazme uporabom jedne tehnike.	5,16,20,23
<u>Analitička faza pri izradi koagulacijskih pretraga</u>		
Načela, oprema i tehnika ispitivanja		
Preporuka 32	Za evaluaciju, validaciju i primjenu koagulometara u svakodnevnoj praksi, laboratoriji bi trebali slijediti preporuke Gardinera i suradnika.	26
Kontrola kvalitete		
Preporuka 33	Unutarnju kontrolu kvalitete potrebno je provesti nakon otapanja svake bočice reagensa, te nakon umjeravanja, preventivnog održavanja i servisa analizatora.	27, 29
Preporuka 34	Za kvantitativne koagulacijske testove, kontrolne plazme s normalnim i patološkim vrijednostima potrebno je analizirati svakih osam sati neprekidnog rada.	27, 29

Preporuka 35	Učestalost unutarnje kontrole kvalitete može biti propisana i drugačije nego što je to navedeno u preporuci broj 34, a ovisno o broju analiziranih uzoraka, načinu njihove pripreme i ukoliko je laboratorij proveo analizu rizika prije same primjene.	27, 29
Preporuka 36	Vanjska kontrola kvalitete treba biti sastavni dio ukupnog upravljanja kvalitetom u laboratoriju koji izrađuje koagulacijske pretrage	27, 29
Koagulacijske pretrage		
Protrombinsko vrijeme		
Preporuka 37	Pri određivanju pretrage PV* preporučuje se koristiti i/ili odrediti vrijednost ISIš specifičnu za kombinaciju tromboplastina i koagulometra koja se koristi u laboratoriju čime se postiže veća točnost u određivanju INR -a u odnosu na uporabu generičkog ISIš-ja.	29,30,32
Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme		
Preporuka 38	APTV† nije prikladan test za praćenje terapije s LMWH‡. Za praćenje terapije UHF** pomoću pretrage APTV, preporuka je da svaki laboratorij odredi osjetljivost APTV† reagensa u uporabi na UFH** s ciljem uspostave vlastitog terapijskog intervala.	29,35

Trombinsko vrijeme		
Preporuka 39	Trombinsko vrijeme nije prikladan test za praćenje antikoagulacijske terapije heparinom i direktnim inhibitorima trombina.	39,40
Fibrinogen		
Preporuka 40	Test određivanja funkcionalne aktivnosti fibrinogena je najprikladnija metoda za rutinsku primjenu.	39,42
Preporuka 41	Metoda deriviranog fibrinogena se ne preporučuje za rutinsku uporabu.	42,44,45
Preporuka 42	Imunokemijski testovi za fibrinogen, koji mjere koncentraciju antigena, a ne funkcionalnu aktivnost primjenjuju se isključivo u diferencijalnoj dijagnostici disfibrinogenemije.	5,42
D-dimeri		
Preporuka 43	Rezultate, referentne intervale i granične vrijednosti za pretragu D-dimeri potrebno je uvijek interpretirati ovisno o metodi koju laboratorij koristi.	47,48
<u>Poslijeanalitička faza rada pri izradi koagulacijskih pretraga</u>		
Referentni intervale i granice kliničke odluke		
Preporuka 44	Opća preporuka za svaki laboratorij je određivanje vlastitih referentnih intervala za koagulacijske pretrage na lokalnoj populaciji kada god je to moguće.	25,53-55

Preporuka 45	Referentne intervale za koagulacijske pretrage koji se preuzimaju od proizvođača ili iz literature, preporučeno je prethodno verificirati na uzorku od minimalno 20 do 40 zdravih ispitanika, pri čemu vrijednosti trebaju biti ravnomjerno raspoređene u cijelom preporučenom referentnom intervalu.	25,53
Preporuka 46	Ukoliko laboratorij nije u mogućnosti odrediti vlastiti referentni interval za pretrage APTV† (s), TV‡ (s) i fibrinogen (g/L) preporuka je preuzeti i verificirati referentni interval prema preporuci proizvođača.	25,51-52
Preporuka 47	Za pretragu D-dimeri, preporučuje se utvrditi granične vrijednosti zasnovane na kliničkim podacima.	25,48
Preporuka 48	Pri analizi pedijatrijskih uzoraka potrebno je primijeniti referentne intervale prilagođene dobi kako bi se osigurala ispravna dijagnostika i liječenje djece s poremećajima hemostaze.	54
Preporuka 49	Za laboratorije koji analiziraju pedijatrijske uzorke preporučuje se definiranje referentnih intervala prema dobnim skupinama na vlastitome sustavu. Ukoliko laboratoriji preuzimaju referentne intervale iz literature preporučuje se preuzimanje i verifikacija intervala koji su prilagođeni dobnoj skupini a utvrđeni su u identičnim tehničkim uvjetima.	54
Izveštavanje rezultata		
PV		

Preporuka 50	Rezultate pretrage PV*-a treba izvještavati kao INR samo za bolesnike na terapiji s VKA ^{††} .	30
Preporuka 51	Rezultate pretrage PV*-a za bolesnike koji nisu na terapiji s VKA ^{††} treba izvijestiti kao postotak (udjel).	30
APTV		
Preporuka 52	Uz rezultat APTV [†] izražen u sekundama, uvijek treba izvijestiti i APTV [†] omjer.	29,35-37
TV		
Preporuka 53	Pretraga TV [‡] se izvještava u sekundama.	39,40
Fibrinogen		
Preporuka 54	Funkcionalna aktivnosti fibrinogena mjeri se u sekundama, a rezultat se izvještava u g/L.	42
D-dimeri		
Preporuka 55	Uz rezultat pretrage D-dimeri na nalazu se preporučuje navesti metodu kojom se pretraga određuje zajedno s odgovarajućom vrstom jedinice u upotrebi (DDU ^{‡‡} ili FEU ^{***}).	46,49
Preporuka 56	Rezultate pretrage D-dimeri preporučuje se izvještavati u mjernim jedinicama mg/L DDU ^{‡‡} ili FEU ^{***} .	46,49
Preporuka 57	Ne preporučuje se korištenje komercijalnih testova za D-dimere koji su prisutni na tržištu, a koji ne pružaju informaciju o vrsti jedinice (DDU ^{‡‡} ili FEU ^{***}) koja se u testu koristi.	46,49
Interpretativni komentari		

Preporuka 58	Preporučuje se uvođenje odgovarajućih interpretativnih komentara vezanih za prijeanalitičku i analitičku fazu ispitivanja, kao i onih vezanih uz proširenje prvotnog kliničkog zahtjeva kad god je to opravdano.	56
Kritične vrijednosti		
Preporuka 59	Koagulacijski laboratoriji se potiču da na lokalnoj razini definiraju klinički značajne kritične vrijednosti i/ili prošire postojeći popis kritičnih vrijednosti u suradnji s liječnicima.	57,59
Preporuka 60	Vrijednost INR -a >5,0 smatra se klinički značajnom jer zahtijeva hitnu intervenciju kako bi se smanjio antikoagulacijski učinak varfarina.	58
Preporuka 61	Za praćenje terapije s UFH ^{**} svaki omjer APTV-a† veći 2,5 puta od gornje granice referentnog intervala, može ukazivati na povećani rizik od krvarenja i treba je odmah izvijestiti kliničaru.	56
Preporuka 62	Vrijednost fibrinogena manja od 0,8 g/L ukazuje na povišeni rizik od krvarenja i treba je odmah izvijestiti kliničaru	56,59

*PV-protrombinsko vrijeme; †APTT-aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, ‡TV-trombinsko vrijeme, §ISI-Međunarodni indeks osjetljivosti; ||INR-međunarodni normalizirajući omjer; ¶LMWH-niskomolekularni heparin; **UFH-nefrakcionirani heparin; ††VKA-antagonisti vitamina K antagonist; ‡‡DDU jedinice D-dimera; ***FEU-jedinice ekvivalentne fibrinogenu