

Invloed van verschillende citraatconcentraties op stollingsbepalingen: pre-analytische voorschriften Subcommissie Stolling aangepast

A. CASTEL

De Stichting Subcommissie Stolling (SSS) houdt zich reeds vele jaren bezig met het bewaken en verbeteren van de kwaliteit van het laboratoriumonderzoek op het gebied van de bloedstolling in Nederland. De activiteit van stollingsfactoren kan beïnvloed worden door de omstandigheden waaronder het bloed en plasma verkregen, bewerkt, getransporteerd en bewaard zijn. De SSS heeft in 1995 de 'pre-analytische voorschriften' voor stollingsbepalingen opgesteld. De bedoeling hiervan was om door standaardisatie van het pre-analytische traject te komen tot een kwaliteitsverbetering van het uitgevoerde onderzoek. Deze voorschriften dienen thans te worden herzien en te worden aangepast aan de huidige inzichten. Met name het reeds in het verleden aangegeven gebruik van een concentratie van 0,109 M (3,2%) trinitriumcitraat als anticoagulans, in plaats van de nog veel gebruikte concentratie van 0,129 M (3,8%) trinitriumcitraat, wordt thans nadrukkelijk aanbevolen.

Pre-analytische variabelen

Naast de in de inleiding reeds genoemde citraatconcentratie, waarop hierna nog nader zal worden ingegaan, zijn er een reeks aan pre-analytische condities, die van invloed zijn op het resultaat van het daarna in het materiaal uit te voeren stollingsonderzoek. Te noemen zijn:

- afnamecondities (stuwing, ervaring)
- al of niet gebruiken van de eerste, dan wel volgend afgenomen buizen
- vacuümbuis, resp. open buis
- materiaal van de afnamebuis (glas vs polyethyleen)
- mengen van de buis
- het optreden van hemolyse
- transport van de buis
- centrifugeercondities (g-waarde, temperatuur, aantal malen centrifugereren)
- opslagtijd van het monster
- opslagcondities van het monster

De optimale pre-analytische omstandigheden zijn niet voor alle stollingsbepalingen identiek. Sommige bepalingen, zoals bijvoorbeeld de APTT (geactiveerde partiële tromboplastine tijd) bij de controle van de

therapie met ongefractioneerd heparine, zijn gevoeliger voor pre-analytische variaties dan andere (bijvoorbeeld de PT/INR voor de controle van de therapie met orale anticoagulantia). Omtrent de optimale omstandigheden bestaat in de huidige beschikbare literatuur geen volledige overeenstemming. Bij het opstellen van de nieuwe voorschriften is dan ook een keuze gemaakt uit de bestaande literatuur.

Invloed van de citraatconcentratie

De concentratie van het als anticoagulans gebruikte trinitriumcitraat in de afnamebuis is een belangrijke pre-analytische conditie. Behalve door de SSS in 1995 wordt ook internationaal door de World Health Organization (WHO) en het International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) aanbevolen een 0,109 M (3,2%) concentratie te gebruiken (1-3). In de Verenigde Staten wordt in de nationale richtlijnen zowel het gebruik van 3,2% citraat als van 3,8% citraat toegestaan, zonder dat voor een van beide concentraties een voorkeur wordt uitgesproken (4). Adcock onderzocht het effect van de citraatconcentratie op zowel de APTT als de PT (protrombine tijd) (5). Zij onderzocht vier patiëntengroepen: patiënten zonder een vorm van antistolling, patiënten met intraveneus toegediend heparine, patiënten met heparine die tevens oraal geantistold werden en uitsluitend oraal geantistold patiënten. Bij het gebruik van actin FS voor de APTT en Innovin voor de PT werden significant verschillende referentiewaarden vastgesteld voor de twee verschillende citraatconcentraties, zoals weergegeven in tabel 1. Voor zowel de APTT als de PT werden tussen de vier patiëntengroepen statisch significante verschillen gevonden. De resultaten staan weergegeven in de tabellen 2 en 3. De auteurs concluderen dat het gebruik van twee verschillende citraatconcentraties leidt tot significante verschillen in de uitkomsten van de routinematig gebruikte stollingsbepalingen APTT en PT. Zij bevelen stollingslaboratoria aan zeker te stellen dat binnen het laboratorium slechts één type citraatbuis wordt gebruikt, de gehanteerde referentiewaarden zijn vastgesteld bij een en dezelfde citraatconcentratie, eenzelfde citraatconcentratie te gebruiken waarbij de bij het reagens horende International Sensitivity Index (ISI) werd vastgesteld en dezelfde citraatconcentratie te gebruiken als de gespecialiseerde referentielaboratoria. Tevens bevelen zij aan de concentratie van 3,2% trinitriumcitraat (0,109 M) te hanteren als internationaal te hanteren standaard.

Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Ziekenhuis Bronovo, Den Haag

Correspondentie: Dr. A. Castel, Klinisch chemisch en hematologisch Laboratorium, Ziekenhuis Bronovo, Bronnovolaan 5, 2597 AX Den Haag. E-mail: acastel@bronovo.nl

Tabel 1. Referentiewaarden voor de APTT en de PT in seconden bij gebruik van verschillende citraatconcentraties (5)

Citraat	Actin FS, APTT	Innovin, PT
3,2% (0,109 M)	21,6 – 31,4	8,6 – 10,7
3,8% (0,129 M)	23,8 – 33,0	9,2 – 11,4
P	<0,001	<0,001

Tabel 2. Vergelijking van de APTT (Actin FS) in seconden in verschillende patiëntengroepen bij twee verschillende citraatconcentraties (5)

	3,2% citraat	3,8% citraat	P
Geen antistolling	28,2 ± 4,0	30,3 ± 3,5	0,0006
Heparine i.v.	44,0 ± 11,0	48,6 ± 14,0	0,0001
Heparine i.v. + oac	65,5 ± 16,0	69,0 ± 14,0	0,0109
Orale antistolling (oac)	40,2 ± 9,7	44,1 ± 13,0	0,0001

Tabel 3. Vergelijking van de PT (Innovin) in seconden in verschillende patiëntengroepen bij twee verschillende citraatconcentraties (5)

	3,2% citraat	3,8% citraat	P
Geen antistolling	11,2 ± 2,5	11,8 ± 2,3	<0,0004
Heparine i.v.	16,4 ± 8,3	17,8 ± 9,9	<0,0005
Heparine i.v. + oac	25,1 ± 28,0	26,3 ± 28,0	<0,02
Orale antistolling (oac)	27,6 ± 13,0	34,3 ± 17,0	0,0001

Danielson en medewerkers onderzochten het effect van de gebruikte citraatconcentratie op de PT/INR (6). Bij patiënten, die langdurig en stabiel oraal geantistold waren, werden twee maal twee buizen bloed afgenomen, die respectievelijk 3,2% en 3,8% citraat bevatten. De PT/INR werd op twee verschillende coagulometers (ACL 300 en MLA 1000) bepaald bij beide concentraties. In beide situaties werden significant hogere PT/INR waarden gevonden in de buizen die 3,8% citraat bevatten. De auteurs constateerden dat een aanzienlijk percentage patiënten die bij gebruik van de ene citraatconcentratie adequaat geantistold waren, bij de andere citraatconcentratie of ondergedoseerd leken en dus onvoldoende beschermd waren, of juist overgedoseerd leken en dus gevaar liepen op een bloeding. De auteurs doen de aanbeveling te komen tot het internationaal gebruiken van een citraatconcentratie van 3,2% en gaan zover de industrie te suggereren te stoppen met het leveren van buizen met een 3,8% citraatconcentratie.

Chantarangkul en anderen onderzochten de invloed van de citraatconcentratie op de PT/INR bij gebruik van 12 reagens-instrument-combinaties (7). In het onderzoek werd zowel bij niet-geantistolden patiënten als bij patiënten met orale antistolling gekeken naar het effect op de PT/INR bij het gebruik van 0,129 M citraat, respectievelijk 0,105 M citraat. De onderzoekers vonden significant langere tijden voor de PT in plasma's met de hogere citraatconcentratie. Er werden echter aanzienlijke verschillen gevonden in ratio's (stollingstijd patiënt / normale stollingstijd), wat suggereerde dat de ISI-waarde eveneens afhankelijk is van de citraatconcentratie. Inderdaad werden

bij kalibraties in 0,105 M citraat tot 10% hogere ISI-waarden gevonden dan bij gebruik van 0,129 M citraat. Dit had tot gevolg dat bij gebruik van ISI-waarden, bepaald in 0,129 M citraat, bij PT/INR bepalingen in 0,105 M citraatplasma grote tot zeer grote afwijkingen optraden. Afhankelijk van de gebruikte methoden en instrumenten liepen de gevonden verschillen op tot 60%, waarbij INR-waarden varieerden van 4,5 tot 7,4! Ook deze auteurs roepen op tot internationale consensus omtrent de te gebruiken citraatconcentratie, waarbij zij een voorkeur uitspreken voor de door de WHO gesteunde 0,109 M citraat (1).

Hoewel vrijwel alle aanbevelingen spreken over 0,109 M als de gewenste citraatconcentratie wordt er ook veel gebruik gemaakt van buizen met daarin 0,105 M citraat. Dit heeft veelal een praktische achtergrond, omdat een aantal fabrikanten deze concentratie levert. Van den Besselaar en anderen hebben zeer recent een onderzoek uitgevoerd naar de verschillen in ISI-waarde bij gebruik van 0,109 en 0,105 M citraat (8). Zij gebruikten hierbij 7 verschillende tromboplastinepreparaten en verscheidene stollingsanalyzers. De bloedafname werd verricht in zowel gesiliconeerde glazen vacuümbuizen, als polyethyleenterephthalaat vacuümbuizen. Bij een instrument bleek er sprake van een verschil van 5,4% in ISI-waarde tussen de twee citraatconcentraties. In alle andere gevallen echter bleken de verschillen niet groter dan 3% bij gebruik van beide buistypes. De auteurs concluderen hieruit dat de verschillen in ISI-waarden bij gebruik van 0,105 M of 0,109 M citraat niet significant verschillen. Daarentegen werden significante ISI-verschillen (tot 7%) gevonden bij het gebruik van glazen buizen enerzijds en kunststof buizen anderzijds, zowel bij 0,105 M als bij 0,109 M citraat. Gebruik van ISI-waarden, bepaald in 0,105 M citraat, bij PT/INR bepalingen in 0,109 M en omgekeerd leverden verschillen in INR-waarden op tot 14%. Dergelijke grote verschillen kunnen aanleiding geven tot het veranderen van de dosering bij patiënten die behandeld worden met orale anticoagulantia.

Samenvattend is er dus alle reden om op grond van de bestaande richtlijnen en de beschikbare literatuur alle stollingslaboratoria in Nederland met klem op te roepen over te gaan op het gebruik van 0,109 of 0,105 M trinitriumcitraat als anticoagulans bij stollingsonderzoek.

Invloed van het bloedvolume in de afnamebuis

Het is bekend dat bij het gebruik van de APTT voor de controle van patiënten die worden behandeld met ongefractioneerd heparine, rekening dient te worden gehouden met de nodige (pre-)analytische variabelen. Belangrijke pre-analytische variabelen zijn in dit opzicht de kwaliteit van de bloedafname, het transport van het monster en het afnametijdstip na start van de behandeling met heparine. Siegel en anderen onderzochten de invloed op de uitslag van de APTT van de wijze waarop de afnamebuis wordt gevuld met bloed en stelden vast, dat hierbij sprake is van een belangrijke pre-analytische conditie (9). De auteurs ontwierpen een z.g. "partial-draw" buis, met dezelfde afmetingen als de normale 4,5 ml 13 x 75 mm Vacutainer

afnamebuis, maar met een minder sterk vacuüm, zodat in plaats van 4,5 ml bloed slechts 2,7 ml bloed werd opgezogen. Hierbij werd de ratio tussen de hoeveelheid bloed en het anticoagulans in de buis gehandhaafd op 9:1. De onderzoekers stelden vast dat er sprake was van een significant verschil in uitkomsten van de APTT, wanneer deze buiten het referentiegebied lagen, waaronder begrepen de APTT-waarden in het therapeutische gebied. Binnen het referentiewaardengebied werden geen significante verschillen gevonden. In de "partial-draw" buizen werden kortere tijden gevonden voor de APTT dan in de "full-draw" buizen. Hoewel de auteurs de gevonden verschillen niet echt konden verklaren, vermoedden zij dat de oorzaak gezocht zou moeten worden in het verschil in stollings-activatie tussen beide buizen en een mogelijk verschil in het vrijkomen van plaatjesfactor 4 uit de trombocyten. Zij concludeerden dat laboratoria bij het vaststellen van een therapeutisch gebied voor de APTT bij de behandeling met ongefractioneerde heparine, terdege rekening moeten houden met het volume van de afnamebuis.

In april van dit jaar heeft de firma Becton Dickinson besloten de levering van "partial-draw" vacutainer buizen met ingang van 1 oktober 2000 te beëindigen (10). Aanvullend eigen onderzoek toonde aan dat door het lagere vacuüm in de "partial-draw" buis deze buizen zich langzamer vullen met bloed bij een grotere buisoppervlakte / bloed ratio. Dit leidt tot een toename van het contact tussen de binnenwand van de buis en het instromende bloed, waardoor er een grotere activatie van bloedplaatjes ontstaat. Dit manifesteert zich in een toegenomen uitstort van de alfa granula uit de plaatjes en een toename van plaatjesfactor 4 (PF4). PF4 veroorzaakt een verhoogde mate van neutralisatie van heparine, waardoor uiteindelijk een verkorting van de APTT optreedt. Klinische studies toonden aan dat er geen significant effect is van de "partial-draw" op de APTT en PT bij normale, niet-geantistolde individuen (11)(12).

Centrifugatie

In het voorjaar van 2000 heeft de Stichting Subcommissie Stolling een enquête uitgevoerd onder de deelnemers aan het kwaliteitscontroleprogramma dat door de stichting wordt verzorgd. Hierin werd ook aandacht besteed aan de wijze waarop in de diverse laboratoria het afgenomen bloed werd gecentrifugeerd. Daartoe werden de volgende twee vragen gesteld:

Kunt U aangeven op welke wijze in Uw laboratorium op dit moment plasma ten behoeve van routinematig stollingsonderzoek wordt bereid?

Heeft U in Uw laboratorium de mogelijkheid om bloed bij een hogere g-waarde te centrifugeren?

De enquête kende een hoge respons en er werden vele antwoorden ontvangen. Helaas bleek de werkwijze met betrekking tot de centrifugatie van het bloed dermate divers dat verdere uitwerking van de antwoorden nauwelijks zinvol bleek. Wel is de grote mate van diversiteit op zichzelf uiteraard reeds reden om te streven naar een meer uniforme werkwijze. Besloten is in de nieuwe pre-analytische voorschriften voor stollingsbepalingen de volgende aanbeveling op

te nemen, mede gebaseerd op recent gepubliceerde richtlijnen hieromtrent (13): afgesloten buizen gedurende 15 minuten bij minimaal 2.500 x g, ongeremd, bij kamertemperatuur centrifugeren. Bij bloed, uitsluitend bestemd voor de PT/INR bepaling, kan wel geremd worden na centrifugatie. Normaliter is een gekoelde centrifuge niet noodzakelijk, maar wel bij de bepaling van de labiele factoren V en VIII; in dat geval bij voorkeur bij 4°C centrifugeren. Bij noodzaak tot <10 plaatjes/nl: nogmaals minimaal 15 minuten bij 2.500 x g en bij 4°C centrifugeren

Bewaarcondities en afwijkende hematocriet

In de nieuwe pre-analytische voorschriften voor stollingsbepalingen, zoals deze elders in dit tijdschrift zijn opgenomen, zijn de aanbevolen condities voor het bewaren van bloed en plasma ten behoeve van stollingsonderzoek in een overzichtelijke tabel weergegeven (14). Korthedshalve wordt hier volstaan met een verwijzing naar deze tabel. Hetzelfde geldt ten aanzien van de correctie die zou moeten worden toegepast met betrekking tot de verhouding tussen het bloedvolume en het in de afnamebuis aanwezige anticoagulans, indien er sprake is van een sterk afwijkende hematocriet van het afgenomen bloed. Aan de nieuwe pre-analytische voorschriften is een appendix toegevoegd, waarin aan de hand van enkele rekenvoorbeelden op heldere wijze wordt toegelicht hoe te handelen in dergelijke situaties.

Literatuur

1. Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO techn rep series, no 889, 1999.
2. Ingram GIC, Hills M. Reference method for the one-stage prothrombin time test on human blood. *Thromb Haemost* 1976; 36: 237-238.
3. International Committee for Standardization in Haematology and International Committee on Thrombosis and Haemostasis. ICSH/ICTH recommendations for reporting prothrombin time in oral anticoagulation control. *J Clin Pathol* 1985; 38; 133-134.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays. 2nd ed (approved guideline). NCCLS document H21-A2 (ISBN 1-56238-129-6), 1991.
5. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Clin Pathol* 1997; 107: 105-110.
6. Danielson CFM, Davis K, Jones G, Benson J, Arney K, Martin J. Effect of citrate concentration in specimen collection tubes on the International Normalized Ratio. *Arch Pathol Lab Med*. 1997; 121: 956-959.
7. Chantarangkul V, Tripodi A, Clerici M, Negri B, Mannucci PM. Assessment of the influence of citrate concentration on the International Normalized Ratio (INR) determined with twelve reagent-instrument combinations. *Thromb Haemost* 1998; 80: 258-262.
8. Besselaar AMHP van den, Chantarangkul V, Tripodi A. A comparison of two sodium citrate concentrations in two evacuated blood collection systems for prothrombin time and ISI determination. *Thromb Haemost* 2000; accepted for publication.

9. Siegel JE, Bernard DW, Swami VK, Sazama K. APTT results from partial- vs full-draw tubes. *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 184-187.
10. Becton Dickinson and Company. Customer technical information notice. Low volume partial draw sodium citrate tubes and APTT results (1.8 and 2.7 ml, 0.105 and 0.129 M). 20 April 2000.
11. Lawrence JB. Laboratory monitoring of anticoagulant therapy: the key role played by preanalytical variables. *LabNotes* 1999; 9: no 1.
12. Nelson DE. Current considerations in the use of the APTT in monitoring unfractionated heparin. *Clinical Laboratory Science* 1999; 12: 359-364.
13. Walker ID. Blood collection and sample preparation: pre-analytical variation. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F (editors), 2nd revised edition of ECAT assay procedures. A manual of laboratory techniques. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999; 21-28.
14. Stichting Subcommissie Stolling. Pre-analytische voorschriften voor stollingsbepalingen. Den Haag, mei 2000.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 299-300

Kalibratie 2000

F.J.L.M. HAAS, A.M.H.P. van den BESSELAAR, A.J.M. van der HEIJ-KOENE, G.L.A. REIJNIERSE

Als onderdeel van het Kalibratie 2000 plan zijn door de CCKL Stichting Subcommissie Stolling (SSS) een tweetal projecten voorgedragen: de harmonisatie van de APTT bepaling ten behoeve van het monitoren van de therapeutische toediening van niet-gefractioneerde heparine en de harmonisatie van de bepaling van fibrinogeen, antitrombine en factor VIII:C (1).

Het eerste project is bijna afgerond en de voorlopige resultaten zijn gepresenteerd tijdens het SSS Stollingssymposium op 18 mei jl. te Apeldoorn. De deelnemers aan dit project krijgen nog de gelegenheid commentaar te geven op hun eigen resultaten. Het tweede project verkeert nog in de voorbereidingsfase en zal nader worden toegelicht.

Alle deelnemers aan het kwaliteitscontroleprogramma van de SSS zijn benaderd met de vraag of ze geïnteresseerd zijn in deelname aan een pilotstudie voor één of meerdere van de genoemde bepalingen. Op basis van de aanmeldingen zijn de deelnemers ingedeeld in clusters van labparen (tweelingstudies), waarbij door de verschillende combinaties de volgende drie groepen zijn gevormd: fibrinogeen 40 deelnemers, antitrombine 32 deelnemers en factor VIII:C 22 deelnemers.

Alle deelnemers is verzocht tenminste een 15-tal monsters, gespreid over het gehele meetbereik, te verzamelen en in tweevoud in te vriezen bij een temperatuur <-28°C. Hierdoor zijn in combinatie met het toegevoegde laboratorium per bepaling tenminste 30 patiëntenmonsters gegarandeerd. Deze monsters dienen in drie meetseries van 10 patiëntenmonsters in combinatie met drie commerciële plasma's te worden gemeten.

Voor de selectie van de commerciële monsters zijn

alle firma's die op de Nederlandse markt actief zijn benaderd met de volgende vragen:

- Beschikken ze over kalibratie- of controleplasma's voor de genoemde bepalingen.
- Zijn ze bereid voor de pilotstudie de plasma's met 50% korting te leveren.
- Garanderen ze voor een mogelijke vervolgstudie plasma's van dezelfde batch met een geldige houdbaarheidstermijn.
- Tegen welke prijs kunnen de plasma's voor de vervolgstudie worden geleverd.

Er is door negen firma's een offerte uitgebracht en bij zes firma's zijn inmiddels plasma's besteld. De keuze van de plasma's is gebaseerd op de combinatie van opgegeven range en prijs. De plasma's zullen door SSS worden voorzien van eigen etiketten en de verwerking plus rapportage zal gecodeerd plaatsvinden ter voorkoming van oneigenlijk gebruik van de resultaten. De firma's zullen vanzelfsprekend worden geïnformeerd over de resultaten van hun eigen product.

Commerciële monsters kunnen zich anders gedragen dan patiëntenmonsters en daarbij kan het onderscheid worden gemaakt in een tweetal mogelijkheden, en daarmee samenhangend de statistische protocollen: de oorzaak is bekend, dan spreekt men over interferentie, en is EP7-P (2) het aanbevolen protocol, of de oorzaak is onbekend, ook wel matrix effect genoemd, en dient het EP14-P protocol te worden gebruikt (1, 3).

Bij het matrixeffect is er mogelijk een wisselwerking tussen een aantal karakteristieken van de gebruikte meetmethode, zoals het ontwerp van het meetinstrument, de samenstelling van de gebruikte reagentia, het principe van de meetmethode en de gebruikte kalibratie- of controlematerialen.

Doordat commerciële materialen zich anders gedragen dan patiëntenmaterialen kunnen de volgende drie situaties zich voordoen:

- de resultaten lijken goed, maar zijn foutief
- de resultaten lijken foutief, maar zijn goed
- de resultaten zijn goed

Klinisch Chemisch Laboratorium, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein

Correspondentie: F.J.L.M. Haas, St. Antonius Ziekenhuis, Postbus 2500, 3430 EM Nieuwegein. E-mail: F.Haas@kcl-azn.demon.nl