Vacuette News greiner bio-one

ฉบับที่ 6 เดือน พฤษภาคม - สิงหาคม 2546

ที่ปรึกษา
คุณสมพงษ์ จรุงกีรติวงศ์
คุณอมราภรณ์ จรุงกีรติวงศ์
คุณจิโรจน์ เตชะวณิชย์
บรรณาธิการ
คุณดุสิต จินดากุล
กองบรรณาธิการ
คุณสมชาย มงคลรัตนาสิทธิ์
คุณสรัญญา มงคลรัตนาสิทธิ์
คุณสุมาลี ศรีอำนวยไชย
คุณเรืองรัตน์ จันทฤทธิ์
คุณชาติชาย เทียนถาวร

กล่าวทักทาย

สวัสดีครับ Vacuette News ฉบับที่ 6 Vacuette News บริษัทฯ มีความตั้งใจที่จะเป็นสื่อกลางในการเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการทางห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนางานและคุณภาพในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ***ฉบับนี้มีผู้สอบถามเกี่ยวกับ 3.2% Sodium Citrate Coagulation Tubes มาเป็นจำนวนมาก*** *ทางกองบรรณาธิการจึงได้นำมาเป็น Topic ในฉบับนี้ สำหรับเนื้อหา Vacuette News ประกอบด้วย*

- ☛ *3.2% หรือ 3.8% Sodium Citrate .*
- ☛ *H21-A3 Collection, Transport , and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays ; Approved Guideline-Third Edition.*

หากท่านใดมีข้อสงสัยหรืออยากให้ทางกองบก.นำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับ Blood Collection System , Pre analytical Process และจุลชีววิทยา สามารถเสนอแนะมาได้ เพื่อที่จะได้นำมาจัดพิมพ์หรือจัดทำลงในฉบับถัดไป

บรรณาธิการ

ผู้พิมพ์ : บริษัท กรุงเทพ อินเตอร์ โปรดักส์ จำกัด 7/75-76 หมู่ 11 ถนนรามอินทรา แขวงคันนายาว
เขตคันนายาว กรุงเทพฯ โทร. 0-2948-6906-8 โทรสาร 0-2948-6909
Email : bip@clickta.com

3. 2 % หรือ 3. 8 % SODIUM CITRATE (COAGULATION TUBE)

Coagulation tube **เป็นหลอดเก็บเลือดในงาน** Hemostasis **และ** Coagulogram ปัจจุบันห้องปฏิบัติการนิยมใช้ชนิดที่เป็น Sandwich Coagulation tube with Doulbe walled technology โดยหลอดจะมีลักษณะเป็น 2 ชั้น ผนังหลอดชั้นนอกเป็นพลาสติก ชนิด Polyethylen - therephthalate (PET) ทำหน้าที่รักษาสภาพสูญญากาศสามารถทนแรงปั่นได้ถึง 10,000 g ตกไม่แตก ช่วยลดอุบัติการการติดเชื้อของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจากหลอดเลือดแตกแล้วเกิดบาดแผลจากแก้วบาดมือระหว่างปฏิบัติงาน ส่วนผนังหลอดชั้นในเป็นพลาสติกชนิด Polypropylene (PP) (Nonactivating surface container)มีคุณสมบัติยับยั้งการกระตุ้นเกร็ดเลือดและป้องกันการระเหยของสารกันเลือดแข็งที่เป็นของเหลวในหลอด

Coagulation tube มีความเข้มข้นของสารกันเลือดแข็ง 2 ชนิด คือ 3.2 % (0.109 mmol / L) Sodium Citrate และ 3.8 % (0.129 mmol / L) Sodium Citrate **ซึ่งปัจจุบัน NCCLS แนะนำให้ใช้ 3.2 % Sodium Citrate**

จากการศึกษาตามตารางที่ 1 พบว่าความเข้มข้นของ Sodium Citrate มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ APTT และ PT อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในค่าที่เกิน Normal Range และใช้น้ำยาในการตรวจวิเคราะห์ที่เป็น Responsive Reagent **เช่น** Dade Actin FS, Dade Innovin ซึ่งอาจทำให้เกิด Interlaboratory Variation ได้หากใช้ความเข้มข้นของ Sodium Citrate ที่ต่างกัน

Table 1. Normal PT and APTT Range - Citrate Effects

Citrate Concentration	Dade Actin FS APTT	Dade Innovin PT	Dade Actin APTT	Dade Thromboplastin C-Plus
3.2 %	22 – 31	8.6 – 10.7	23 – 33	12 – 14
3.8 %	24 – 33	9.2 – 11.4	22 – 31	11 – 14
p	< .001	< .001	Non - significant	Non - significant

ในกลุ่มที่ใช้ Responsive Reagent ค่า Normal Range ของ APTT และ PT จะมีค่าต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า 3.8 % Citrated Plasma จะ Shift สูงกว่า 3.2 % Citrated Plasma

ในกลุ่มที่ใช้ Non Responsive Reagent **เช่น** Dade Actin, Thromboplastin C. Plus ค่า Normal Range ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ใน 3.8 % Citrated Plasma และ 3.2 % Citrated Plasma

เหตุผลอื่นที่สนับสนุนให้ใช้ 3.2 % Sodium Citrate

1. ปัจจุบันการผลิตน้ำยามักจะมีการทำ Calibration ด้วย 3.2 % Sodium Citrated Plasma
2. 3.2 % Sodium Citrate มี Osmolarity ใกล้เคียงกับ Human Plasma
3. เมื่อเจาะเลือดไม่ถึงระดับ Filling Line พบว่า 3.2 % Sodium Citrated Plasma มีผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่า 3.8 % Sodium Citrated Plasma (ที่มาข้อมูลจากการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องQuality Management in Coagulation Laboratory)

คุณสมบัติของ Coagulation Tubes คือ มีสาร Tri-Sodium Citrate เป็นสารกันเลือดแข็งมาตรฐานสำหรับCoagulation Tests. Tri-Sodium Citrate **ทำหน้าที่เป็นสารกันเลือดแข็งตัวและบัฟเฟอร์ (Sodium Salt of Citric Acid Buffered Sodium Salt)** อัตราส่วนของ Sodium Citrate ต่อเลือดเท่ากับ 1:9 (9 NC) ในส่วนของการเป็นสารกันเลือดแข็งตัว Citrate จะจับกับ Calcium ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยการดึง Calcium ออกจาก Prothrombinase Complex ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน Prothrombin ไปเป็น Thrombin ในส่วนของการเป็นบัฟเฟอร์ Citrate จะควบคุมระดับ pH ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 7.10-7.35 เนื่องจากค่า pH ที่สูงหรือต่ำกว่าระดับดังกล่าวอาจมีผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ทาง Coagulogram ทำให้ผลคาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้

สิ่งที่ควรคำนึงถึงใน Coagulation Laboratory ส่วนใหญ่มักเกิดจากความผิดพลาดหรือไม่ได้มาตรฐานใน Preanalytical Process ได้ คือ

1. การเจาะเลือดที่ต้องการ Follow-up ระดับ Coagulation Results ควรเจาะเลือดเก็บสิ่งตรวจในเวลาใกล้เคียงกันโดยปกติมักจะเป็นตอนเช้า เพื่อป้องกันผลกระทบจาก Bodily Physiological Changes
2. การรัด Tourniquet นานเกินไป (ไม่ควรรัดนานเกิน 1 นาที) จะทำให้เกิด Hemoconcentration และนำไปสู่การเพิ่มขึ้นเอง Coagulation Protein หรือ Platelet Activation
3. กรณีการเก็บสิ่งตรวจที่มีสัดส่วนของเลือด : สารกันเลือดแข็ง (Sodium Citrate) ไม่ได้ 9:1 จะทำให้Coagulation Results Prolonged หรือ Shortened ได้ ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยที่มี Hematocrit มากกว่า 55 % หรือน้อยกว่า21 % ปริมาตรของ Sodium Citrate ต้องปรับก่อนตามสูตร

$$C = 0.00185 \times (100-H) \times V$$

(C = Volume of 3.2 % Sodium Citrate in ml, H = Hematocrit in percent. V= Volume of blood in ml)

4. เลือดที่เก็บจาก Lines หรือ Catheters ที่ผู้ป่วยใส่อยู่มักจะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ Coagulation results ผิดพลาด เนื่องจาก

4.1 Dilution Effect และ Heparin Contamination จากการ Flush ล้างไม่ถูกต้อง ทำให้มี Heparin เหลือค้างอยู่ในสาย

4.2 Air leaks หรือตำแหน่งของ Catheter ไม่ตรงเส้น ทำให้เลือดเกิด Hemolysis ตาม NCCLS แนะนำให้ Flush สายด้วย 5 ml ของ Saline แล้วดูดเลือดทิ้งไป 5 ml หรือ 6 เท่าของDead Space Volume ของ Catheter

5. หลังจากการเก็บเลือดให้ mix หลอดเลือดแบบ inverted 6-8 ครั้ง/ Tube หลังจากนั้นให้นำส่งห้องปฏิบัติการทันที เพื่อนำไปปั่นแยก Plasma ด้วยเครื่อง Centrifuge ชนิด Swing-out Rotator ตามตารางที่ 2. แล้วจึงนำชนิดของ Citrated-Plasma ที่ปั่นแยกได้ตามคุณสมบัติของการทดสอบไปทำการตรวจวิเคราะห์

ตารางที่ 2. การปั่นแยกชนิดของ Citrated Plasma (ข้อมูลจากVacuette Leaflet 980200 Rev.03 Nov. 2002)

Tube	จำนวน RCF ของการปั่น (RELATIVE CENTRIFUGE FORCE)	เวลาที่ใช้ในการปั่น
Platelet Tests Platelet Rich Plasma (PRP)	150 g	5 นาที
Routine Tests Platelet Poor Plasma (PPP)	1,500 – 2,000 g	15 นาที
Preparation for Deep Freeze Plasma Platelet Free Plasma (PFP)	2,000 – 3,000 g	20 นาที

6. เพื่อให้หลอดเก็บเลือดอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์พร้อมใช้งาน มีหลักปฏิบัติเกี่ยวกับการเก็บรักษาหลอดก่อนการใช้งานดังนี้

6.1 ควรหลีกเลี่ยงการถูกแสงแดดโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อุณหภูมิสูงระดับ 50 องศาเซลเซียส จะทำให้ คุณสมบัติของหลอดเสียไป เช่น ปริมาณ Vacuum, การระเหยของสารกันเลือดแข็งที่เป็นน้ำ เป็นต้น

6.2 **ควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ 4 – 25 องศาเซลเซียส**

6.3 หลีกเลี่ยงการเก็บรักษาในสถานที่ หรือบริเวณ เครื่องมือที่มีความร้อนสูง เช่น Hot Air Oven, Autoclave

6.4 ควรตรวจดู Expiration date ของหลอดเก็บเลือดอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันการเกิด Death stock หรือการนำหลอดที่หมดอายุไปใช้งาน ซึ่งอาจทำให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง จัดให้มีระบบ First In และระบบ First Out ในการเก็บ Stock และการเบิกไปใช้งาน

Reference :

1. Adcock, Dorothy M : Kressin : Marlar, Richard A PhD : Preanalytical Variables in the Routine Coagulation Laboratory. ASCP Teleconference Series Sep. 12, 2000 : Program No. 6064
2. NCCLS – Guidelines, Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays: Approved Guideline – Third Edition, H21-A3 : Vol 18 No.20”5.2.1 December 1998
3. Adcicjm dorothy M: Kressin: David C: Marlar, Richard A PhD: Effect of 3.2 % vs 3.8 % Sodium Citrate Concentration on Routine Coagulation Testing Am J Clin Pathol. 1997:107:105-110
4. Vacuette Evacuated Blood Collection System Leaflets . 980200 Rev.03 Nov. 2002

H21-A3 Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline-Third Edition

Abstract

This edition of H21-A3 is an update of the previous edition published in 1991. The guideline provides procedures for the collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing. Tests of the coagulation system are very sensitive to storage (time and temperature), concentration of anticoagulant, and surface of containers; attention to these parameters is important. H21-A3 is primarily directed toward laboratory and/or clinical personnel responsible for obtaining patient specimens and preparing plasma for analysis by coagulation testing

Volume 18 Number 20

Suggested Citation

NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline-Third Edition. NCCLS document H21-A3 (ISBN 1-56238-363-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania 19087, USA 1998

Proposed Guideline

September 1980

Tentative Guideline

January 1982

Approved Guideline-First Edition

December 1986

Approved Guideline-Second Edition

December 1991

Approved Guideline-Third Edition

December 1998

Foreword

H21-A3 is part of a series of guidelines involving methodology in blood coagulation testing. Because of the many variables that can affect coagulation test results, the Subcommittee on Coagulation concluded that it would be advantageous to provide a guideline which describes procedures for collection, storage, and preparation of blood or plasma before and during coagulation testing. This publication should increase the uniformity of coagulation testing and, thereby, reduce many variables that can affect the test results. Other publications in the series deal with specific coagulation assays such as the prothrombin time test, the activated partial thromboplastin time test , the fibrinogen assay, coagulation factor assays, bleeding time test, as well as other assays.

The second-edition approved guideline (H21-A2) received a wide review by the patient-testing community and has generated numerous comments. The subcommittee wishes to thank all commentors for their recommendations. Each comment was carefully reviewed and changes were made where appropriate. All comments and the subcommittee responses to these comments may be found in the document.

Key Words

Activated partial thromboplastin time, coagulation, coagulation factors, citrate, control (plasma), fibrinogen, prothrombin time, sample storage, specimen collection, specimen transport, thrombin time.

1 Introduction

A procedural guideline for the collection, transport, and processing of specimens for coagulation tests is necessary as many variables may affect test results, (e.g., concentration and amount of anticoagulant, specimen and sample storage time and temperature, the surface of containers in which the specimen is obtained and stored). Because important diagnostic and therapeutic decisions are based on the results of coagulation tests a procedural guideline for the collection, transport, and processing of blood specimens for the general performance of coagulation assays is warranted.

2 Scope

This guideline covers the procedures for the collection, transport, and processing of specimens for coagulation tests. Many variables including anticoagulant amount and concentration, specimen and sample storage, and surface of containers may affect test results. The document is directed toward laboratory and/or clinical personnel responsible for obtaining patient specimens and preparing plasma for analysis by coagulation testing. It is also aimed at manufacturers of products involved in specimen collection, storage, and preparation for coagulation testing. This document does not address whole blood clotting tests or point-of-care testing. In addition, H21-A3 provides general guidelines for performance of coagulation testing. Performance guidelines for specific coagulation assays are addressed in other NCCLS documents such as for PT and APTT assays [e.g., H47- One-stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test], fibrinogen assay (e.g., H30-Procedures for the Determination of Fibrinogen in Plasma), and factor assays (e.g.,H48-Determination of Factor Coagulant Activities).

3 Safety

Because it is impossible to know which blood specimens might be infectious, all patient blood specimens are to be treated with universal precautions. Guidelines for specimen handling are available from the U.S. Centers for Disease Control and Prevention [MMWR 1987;36(suppl 2S):2S-18S]. The most current version of NCCLS document M29- Protection of Laboratory Workers from Instrumental Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue, deals specifically with this issue.

4 Definitions

In the context of this publication, the following definitions apply.

Activated Partial Thromboplastin Time Test (APTT), n-A test used for the evaluation of the intrinsic and common coagulation pathway and for monitoring therapy with unfractionated heparin and certain other anticoagulants. The APTT is the time in seconds required for a fibrin clot to form in a plasma sample after an optimal amount of calcium chloride, a partial thromboplastin reagent (phospholipid), and a contact factor activating agent have been added to the sample.

Anticoagulant, n - An agent that prevents coagulation of blood or blood products.

Blood collection device, n - An evacuated tube, syringe, or other device with nonactivating surface.

Blood collection system, n - A system consisting of several components, such as catheter, luer lock, syringe, needle, and collection device, used for blood collection.

Coagulation factors, n - The various components of the blood coagulation system. The following factors have been identified: (Synonyms which are or have been in use are included.)

- Factor I (fibrinogen)
- Factor II (prothrombin)
- Factor III (thromboplastin, tissue factor)
- Factor IV (calcium)
- Factor V (labile factor)
- Factor VII (stable factor)
- Factor VIII (antihemophilic factor [AHF], antihemophilic globulin [AHG], anti-hemophilic factor A, Factor VIII:C)
- Factor IX (plasma thromboplastin component [PTC], Christmas factor, anti-hemophilic factor B)
- Factor X (Stuart factor, Prower factor, Stuart-Prower factor)
- Factor XI (plasma thromboplastin antecedent [PTA], antihemophilic factor C)
- Factor XII (Hageman factor, surface factor, contact factor)
- Factor XIII (fibrin stabilizing factor[FSF], fibrin stabilizing enzyme, fibre
- Other factors: (prekallikrein [Fletcher factor], high molecular weight kininogen [Fitzgerald])

Control plasma, n - A preparation of fresh, frozen or lyophilized plasma collected from human or animal blood, or artificially derived material, intended for use in the quality control process. Control plasmas are used to monitor all aspects of the laboratory test system, including the reagents, instruments, reconstituting and diluting fluids, and pipets. Normal controls should give test results within the reference interval. Abnormal control plasmas should give values within the clinically relevant abnormal range.

Dead space volume, n - The volume of blood that would fill the length of a catheter lumen. This term is used in the collection of blood from indwelling catheters.

Fibrinogen assay, n - The assay of fibrinogen concentration; it is most commonly measured by the rate at which it is converted to fibrin by the action of thrombin. It is described in NCCLS document H30-Procedure for the Determination of Fibrinogen in Plasma. Other methodologies include precipitation/gravimetric, immunological and nephelometric procedures.

Nonactivating surface, n - A surface that does not activate coagulation factors (as indicated by lengthening or shortening of the PT or APTT).

Prothrombin time (PT) test, n - A test used for evaluation of the extrinsic and common coagulation pathway and for monitoring oral anticoagulant therapy. The PT is the time in seconds required for a fibrin clot to form after tissue thromboplastin and an optimal amount of calcium chloride have been added to the sample (citrated plasma).

Reference interval, n - The range of values (usually 95% confidence limits) found in an apparently healthy population (i.e., not afflicted with a discernable illness). Patient sample, n - A material prepared from the patient blood or plasma specimen and used to obtain information by means of a specific laboratory test.

Patient specimen, n - The discrete portion of a body fluid or tissue taken for examination, study, or analysis of one or more qualities or characteristics. For coagulation testing, the specimen would be anticoagulated blood or plasma.

Thrombin time (TT) test, n - A test used to evaluate the final steps of the coagulation pathway. The TT is the time in seconds required for a fibrin clot to form in a sample after a known amount of thrombin has been added.

5 Specimen Collection

5.1 Methods for Obtaining Blood Specimens

It is recommended that blood specimens for coagulation testing be collected by venipuncture using a blood collection system that collects the specimen directly into a tube containing the anticoagulant. For proper venipuncture technique using an evacuated blood collection set or syringe, see the most current edition of NCCLS document H3 - Procedure for the collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture. All specimens should be collected in a nonactivating surface container.

Syringe draws using a hypodermic needle/syringe may have limitations because of the increased risk of hemolysis and apparent safety issues. With larger syringes, there is an increased chance that clotting may occur. *If a syringe is used, a small volume syringe (< 20 mL) is recommended. If a needle is used on the syringe to* obtain the specimen, appropriate safety procedures should be employed in its removal. (See the most current edition of NCCLS document M29- Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue).

Under certain circumstances blood specimens for coagulation testing may be drawn from an indwelling catheter using a blood collection system or a syringe. When obtaining a blood specimen from a catheter, the components of the blood collection system (catheter, luer lock, syringe, needle, and collection device) should be checked to ensure compatibility to avoid air leaks which may cause hemolysis and incorrect draw volumes. Collection of the blood through lines that have been previously flushed with heparin should be avoided, if possible. If theblood must be drawn through an indwelling catheter, possible heparin contamination and specimen dilution should be considered. The line should be flushed with 5 mL of saline and the first 5 mL of blood or six deadspace volumes of the catheter discarded.

If multiple specimens are collected, the coagulation specimen should preferably be collected into the second or third tube. For the appropriate order of draw when collecting multiple specimens, see the most current edition of NCCLS document H3- Procedures for the collection of Diagnostic Blood Specimen by Venipuncture. If a blood collection set is used and only a coagulation specimen is drawn, a discard tube is recommended to assure maintenance of the proper anticoagulant/blood ratio. If a double syringe technique is used, blood from the second syringe should be used for the coagulation specimen. In the case of any unexplained abnormal coagulation test result, a new specimen should be obtained and the test repeated. If heparin contamination is suspected, the test should be repeated after the specimen is treated with a method that removes or neutralizes heparin.

When using the hypodermic needle/syringe, it is important that the blood is added to the appropriate volume of anticoagulant within one minute of completion of draw. Regardless of the device used for specimen collection, all tubes should be inverted at least four times to mix.

5.2 Anticoagulant and Blood/Anticoagulant Ratio

5.2.1 Anticoagulant

The anticoagulant used for coagulation assays should be 105 - 109 mmol/L, 3.13%-3.2% (commonly described as 3.2%)[5] of the dihydrate form of trisodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7$ x $2H_2O$), buffered or nonbuffered. Other anticoagulants (e.g., oxalate, heparin, or EDTA) are unacceptable .

5.2.2 Anticoagulant/Blood Ratio

The proportion of blood to the sodium citrate dihydrate anticoagulant volume is 9: 1 . Inadequate filling of the collection decice will decrease this ratio, and may lead to inaccurate results.[6,7,8,] The manufacturer's recommendations should be followed.

5.2.3 Citrate Concentration Adjustments

The final citrate concentration in the blood should be adjusted in patients who have hematocrit values above 0.55 (55%). For Hcts below .20, there is no current data available to support a recommendation for adjusting the citrate concentration. The chart in the appendix can be used to determine the amounts of anticoagulant and blood for hematocrit values above 0.55 .

5.3 Needle Gauge

Suitable needle gauges for coagulation tests range from 22 to 19. For the pediatric patient, a 21- to 23-gauge needle may be used. A winged blood collection set of the same gauge can also be used.

6 Specimen Transport, Processing, and Sample Storage

6.1 Preparation of Suitable Plasma Specimens

Specimens that are clotted, collected in the wrong anticoagulant, or are in collection devices that have less than the recommended fill are not suitable for testing and should be rejected. The whole blood specimen should be checked for clot formation by gently inversion and observation. To obtain a plasma sample, the capped specimen tube should be centrifuged at a speed and time required to consistently produce platelet-poor plasma (platelet count<10

x 10^9/L) (10,000/µL). This may be accomplished by centrifuging at 1500 g for no less than 15 minutes at room temperature. We recommend that a swing-out bucket rotor should be used to minimize remixing of the plasma and platelets particularly with plasma removal. Samples that have visible hemolysis should not be used because of possible clotting factor activation and end point measurement. Some current instruments using an optical detector may have problems with end point determinations on samples that are icteric, lipemic, or contain substances that interfere with light transmission. Alternative methods (e.g., mechanical/electromechanical) should be considered.

6.2 Storage

The allowable time interval between collection of the specimen and testing of the sample will depend on the temperature encountered during transport and storage of specimen. Specimens for coagulation testing should be Processed and stored as follows:[9]

- Specimens for PT assays uncentrifuged or centrifuged with plasma remaining on top of the cells in an unopened tube kept at 2 to 4 °c or 18 to 24 °c should be tested within 24 hours from time of specimen collection. If the patient is on both heparin and oral anticoagulant therapy, the PT may vary with time of storage of the specimen unless the PT reagent contains a heparin neutralizer. Specimens for routine APTT assays on nonheparinzed patients uncentrifuged or centrifuged with plasma remaining on top of the cells in an unopened tube kept at 2 to 4 °c or 18 to 24 °c should be tested within four hours from time of specimen collection.
- Specimens for APTT assays suspected to contain unfractionated heparin kept at 2 to 4 °c or 18 to 24 °c should be centrifuged within one hour of collection and the plasma tested within four hours from time of specimen collection. If agitation of the specimen is likely after centrifugation, such as transportation to a remote testing site, the plasma should be removed within one hour of collection and tested within four hours form the time of specimen collection.
- Specimens for other assays (e.g. thrombin time , protein C, Factor V, and Factor VIII) kept at 2 to 4 °c or 18 to 24 °c, should be centrifuged and tested within four hours from time of specimen collection. If the testing is not completed within 24 hours for PT specimens and four hours for APTT and other assay specimens, plasma should be removed from the cell and frozen at – 20 °c for up to two weeks or – 70 °c for up to six months. A frost-free freezer should not be used. Frozen plasma samples should be rapidly thawed at 37 °c while gently mixing and tested immediately; if testing cannot be performed immediately, the sample may be held for a maximum of two hours at 4 °c until tested. The APTT may be affected on specimens which have been frozen.

7. Performance of Coagulation Assays

These are general guidelines applicable to most coagulation assays. The procedures for specific assays are covered in separate NCCLS documents.

7.1 Quality Control

The laboratory should follow generally accepted quality control practices. Specifically, labor personnel with appropriate experience should inspect the quality control results daily to evaluate for trends of shifts, as well as out-of limit results. Individual patient values should be reviewed to look for unusual or unlikely patterns that can indicate a system malfunction or clerical errors. Maintenance of all instruments should be carried out in accordance with manufacturers' directions and all actions documented. **Manufacturers' instructions for reagents and equipment should be followed.** In addition, there should be periodic review (generally monthly) of quality control data to look for long-term changes in the analytic systems and, when appropriate, for the comparison of the laboratory's results with those of a peer group.

Each laboratory should enroll in a proficiency testing program acceptable to the relevant inspecting and accrediting agencies.

The laboratory should keep accurate and complete records of the lot numbers of reagents, reference materials, and, where possible, blood collection devices (if used). All reagents and solutions should be marked as to expiration date, date received, and reconstitution date (when applicable).

7.2 Controls

Normal and abnormal controls should be run in accordance with the recommendations provided in the NCCLS guidelines for specific coagulation assays such as for PT and APTT assays (H47-One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test), fibrinogen assay (H30-Procedure for the Determination of Fibrinogen in Plasma) and factor assays (H48-Determination of Factor Coagulant Activities). Controls, once thawed or reconstituted, should not be refrozen or reused unless otherwise stated by the manufacturer. If the test values for the control samples are not within the established limits, appropriate action must be taken. This can include testing new controls and method troubleshooting. Acceptable results must be obtained before patient samples are tested and reported.

7.3 End Points

End point measurements are read by variety of optical or electromechanical methods using manual, semiautomated, or automated devices. Manual procedures are difficult to standardize and not widely used.

7.4 Reference Intervals

Reference intervals using normal populations of appropriate age and as otherwise defined should be established by each laboratory and they should be verified with any change in reagent lot number, instrument, collecting system, or at least once a year. For more information on reference intervals, see the most current edition of NCCLS document C28 - How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory.

7.5 Single vs. Duplicate Determinations

Determinations are commonly performed in duplicate and the mean of the two values is reported. With improvements in the precision of semiautomated and automated coagulation instruments, singlet testing isacceptable, if appropriate quality standards are met. [10] Single determinations should only be considered with theuse of automated equipment.

8. Reporting of Results

Reporting systems are addressed in each specific assay guideline such as for PT and APTT assays (H47- One-stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test), fibrinogen assay (H30-Procedure for the Determination of Fibrinogen in Plasma), and factor assays (H48-Determination of Factor Coagulant Activities).

References

1. Laxson CJ, Titler MG. Drawing coagulation studies from arterial lines: an integrative literature review. American Journal of Critical Care. 1994; 1”16-24.
2. Gottfried EL, Adachi MM. Prothrombin time and activated partial thromboplastin The first tube. Am J Clin Pathol. 1997; 107”681-683
3. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Are discard tubes necessary in coagulation studies? Lab Med. 1997; 28”530-533.
4. Yawn B, Loge C and Dale J. Prothrombin time, one tube or two. Am J Clin Pathol 1996; 105”794-797
5. Adcock DM, Kressin DC, Marlar Ra. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine Coagulation testing. Am J Clin Pathol. 1997; 107”105-110
6. Peterson P, Gottfried EL. The efects of inaccurate blood sample volume on prothrombin time (PT) and Activated partial thromboplastin time (aPTT)/ Thrombosis and Haemostasis. 1982; 47”101-103.
7. Reneke J, Etzell J, Leslie S, Ng VL, Gottfried EL. Prolonged prothrombin time and activated partial Thromboplastin time due to filled specimen tubes with 109 mmo 1/L (3.2%) citrate anticoagulant. Am J Clin Pathol. 1998; 109”754-757
8. Adcok D, Kessin DC, Marlar Ra. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation Testing Am. J. Clin. Pathol 1998; 109:595-599.
9. Adcock DM, Kressin DC, Marlar Ra. The effect of time and temperature variables on routine coagulation Tests. Blood collection and Fibrinolysis. In press.
10. Koepke JA, McLaren CE, Wijetunga A< Houwen B.A. method to examine the need for duplicate testing of Common coagulation tests. Am J Clin Pathol. 1994;102:242-247