

Rekomendacje • Recommendations

**Postępowanie przedanalizacyjne w laboratoryjnej diagnostyce zaburzeń hemostazy**  
**Zalecenia Sekcji Laboratoryjnej Diagnostyki Zaburzeń Hemostazy**  
**Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej**

**Preanalytical procedure in laboratory diagnostics of coagulation disorders**  
**Recommendations of the Haemostatic Disorders Working Group,**  
**Polish Society of Laboratory Diagnostics**

Anna Raszeja-Specht<sup>1</sup>  
 Jacek Golański<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Biochemii Klinicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny;

<sup>2</sup>Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedra Nauk Biomedycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Opracowanie materiału przed wykonaniem badania z zakresu laboratoryjnej diagnostyki hemostazy w istotny sposób wpływa na końcowy wynik oznaczenia [1-4]. Szacuje się, że błędy związane z niewłaściwym postępowaniem przedanalizacyjnym, wykluczające materiał z dalszych badań i obniżające wiarygodność uzyskiwanych wyników, wynoszą w przypadku hemostazy 5-10% i mogą pojawiać się na kilku etapach postępowania z materiałem (tab. I).

Z analizy piśmiennictwa wynika, że obecnie przy pobieraniu krwi do badań hemostazy nie podlega dyskusji zastosowanie cytrynianu sodu o stężeniu 3,2% [1], ale nie ma jasnych danych na temat przewagi buforowanego cytrynianu nad niebuforowanym [5].

Niestety, w dalszym ciągu nie ma pełnej zgodności w spr-

wie sposobu pobierania krwi do badań [6-10] i czasu jego przechowywania przed wykonaniem oznaczeń [1, 11-14].

Szczególnie wiele kontrowersji wywołały zalecenia opublikowane przez Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), z których wynika, że krew do badania czasu protrombinowego można przechowywać przez 24 godziny [1]. Zalecenie to jest powielane przez wydawnictwa książkowe [2, 3], warto jest jednak zwrócić uwagę na zastrzeżenie, iż konieczne jest ustalenie własnych standardów przechowywania materiału [15]. W przywoływanej w dokumencie CLSI publikacji Van Geest-Daalderop i wsp. sugerowany, maksymalny czas przechowywania materiału przed oznaczeniem wynosi 6 godzin. Dyskusja o czasie przechowywania materiału [11-14, 16] będzie prawdopodobnie trwała do czasu

Tabela I. Przedanalizacyjne problemy w badaniach układu hemostazy [18,19]

Procedura przedanalizacyjna	Problemy związane z procedurą
Przygotowanie pacjenta	Aktywność fizyczna, dieta, używki, leki itp.
Pobranie próbki	Identyfikacja pacjenta/ próbki Niewłaściwa procedura pobrania (wybór miejsca pobrania, staża) Niewłaściwy sprzęt (igły, motylki, zestawy infuzyjne) Niewłaściwe próbówki/ antykoagulant Niewłaściwa objętość (proporcje krew/ antykoagulant) Hemoliza
Postępowanie z próbką	Mieszanie próbki (wykrzepianie)
Transport próbki	Temperatura, czas, warunki
Przechowywanie próbki	Temperatura, czas, mrożenie
Przygotowanie próbki	Wirowanie: temperatura, czas, prędkość, postępowanie z osoczem

opublikowania nowych zaleceń CLSI.

Na spotkaniach Sekcji Laboratoryjnej Diagnostyki Hemostazy Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej podjęto decyzję o przygotowaniu polskich zaleceń w sprawie postępowania przedanalizycznego w diagnostyce hemostazy, ze szczególnym uwzględnieniem czasu przechowywania materiału.

Zalecenia przeznaczone są dla laboratoriów wykonujących podstawową diagnostykę hemostazy, jednakże z uwagi na konieczność opracowywania materiału dla specjalistycznych pracowni dołączone zostały wskazówki dotyczące przygotowania próbek i ich transportu w celu wykonania diagnostyki:

- trombofilii,
- małopłytkowości wywołanej heparyną (HIT – *Heparin Induced Thrombocytopenia*),
- zespołu antyfosfolipidowego (APS - *antiphospholipid syndrome*),
- funkcji płytek krwi.

Podstawą prawną zaleceń jest Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [17]. Przygotowane zalecenia mają na celu uszczegółowienie wytycznych zawartych w wyżej wymienionym rozporządzeniu i z założenia są bardziej rygorystyczne niż te zawarte w dokumencie CLSI. Omówienie kolejnych etapów postępowania przedanalizycznego podzielone jest na zalecenia ogólne i szczegółowe, dedykowane konkretnym oznaczeniom.

## ZALECENIA DOTYCZĄCE POSTĘPOWANIA PRZEDANALIZYCZNEGO

Podstawowe problemy związane z procedurą przedanalizyczną zestawiono w tabeli I.

## PRZYGOTOWANIE PACJENTA

### 1. Zalecenia ogólne

#### Wysiłek

Na 24 godziny przed pobraniem krwi do badań należy unikać intensywnego fizycznego wysiłku. Przed pobraniem krwi zalecany jest relaksujący, 15-20 minutowy odpoczynek.

#### Dieta

W dniu poprzedzającym badanie zalecana jest lekkostrawna, niskotłuszczowa dieta oraz powstrzymanie się od używek, należy uwzględnić pokarmy i suplementy diety bogate w witaminę K i „potencjalnie” przeciwzakrzepowe. Zdecydowanie niewskazane jest picie kawy naturalnej i palenie niktyny w dniu pobrania. Zaleca się w dniu pobrania krwi wypicie ok. 0,5 litra wody.

#### Zmienność dobową

Wskazane jest pobieranie krwi w godzinach porannych (do godz. 10).

### 2. Zalecenia szczegółowe

W celu diagnostyki trombofilii krew należy pobrać przed rozpoczęciem leczenia przeciwzakrzepowego lub po upływie odpowiednio długiego czasu po jego zakończeniu (1-2 tygodnie). U osób leczonych heparyną występuje obniżenie aktywności antytrombiny (AT), a u osób leczonych pochodnymi kumaryny występuje obniżenie stężenia czynników z grupy protrombiny oraz białek C i S. W czasie incydentu zakrzepowo-zatorowego oraz bezpośrednio po nim może dojść do obniżenia poziomu AT i aktywności białka S, dlatego badania można wykonywać po 6 tygodniach od wystąpieniu incydentu zakrzepowego. Niewskazane jest wykonywanie badań w czasie infekcji. W tabeli II zaznaczono kierunki zmian podstawowych i dodatkowych badań układu krzepnięcia.

Tabela II. Kierunki zmian najważniejszych parametrów układu hemostazy w różnych stanach klinicznych i w trakcie terapii przeciwzakrzepowej [19].

	PLT	PT	APTT	Fibrynogen	Dimer D	Białko C	Białko S	AT
Ciąża	↓	N	N	N lub ↑	↑	↑	↓	↑
Okres noworodkowy	↑	↑N	↑N	↑	↑	bd	bd	bd
Stan zapalny	↑	↑N	↑N	↑	N lub ↑	bd	bd	N lub ↓
Zabieg operacyjny lub uraz	↑	↑N	↑N	↑	N lub ↑	bd	bd	bd
Nowotwory	↓↑N	↓↑N	↓↑N	↓↑N	↓↑N	↓↑N	↓↑N	↓↑N
Choroby wątroby	↓↑N	↑	↑N	↓↑N	↓↑N	↓N	↓N	↓N
Aktywna zakrzepica*	↓	↓↑N	↑↓N	↑↓N	↑↑	↓	↓	↓
Heparyna	N↓	N↓	↑↑**	bd	bd	bd	bd	↓↓
Antagoniści witaminy K	N	↓↓	N↓	N	N	↓	↓	N

\* Diagnostyka laboratoryjna trombofilii możliwa jest do wykonania po 6 tygodniach od wystąpienia incydentu zakrzepowego.

\*\* Niskocząsteczkowa heparyna może nie wpływać na wydłużenie APTT

bd – brak danych

W przypadku oznaczeń czynnika von Willebranda, czynnika VIII i badań funkcji płytek u kobiet zaleca się pobieranie krwi w okresie miesiączki lub we wczesnej fazie folikularnej [20].

## POBIERANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

### **Sposób pobrania materiału**

Zaleca się pobieranie krwi w pozycji siedzącej. W celu unikania problemów z hemolizą wywołaną przez alkohol, skórę po dezynfekcji należy dokładnie osuszyć. Do pobierania krwi należy używać igły o możliwie dużej średnicy (nie więcej niż 19G), dostosowując jej rozmiar do objętości pobieranej krwi. Dla dorosłych minimalna średnica igły wynosi 21G, dla dzieci minimum to rozmiar 23G [1].

Krew należy pobierać z dużych naczyń żylnych, przede wszystkim z żyły łokciowej przy zastosowaniu minimalnego ucisku stazy, bezpośrednio do probówek z antykoagulantem [8]. W wyjątkowych przypadkach możliwe jest wykorzystywanie do badań koagulologicznych krwi tętniczej, jednak w tym przypadku konieczna jest walidacja metody. W przypadku badań PT probówka koagulologiczna może być pobierana w pierwszej kolejności (nie ma potrzeby odrzucania pierwszej porcji krwi) [21]. Jeżeli krew musi być pobrana ze stałego dościa (brak możliwości uzyskania krwi w zalecany sposób), konieczne jest odciągnięcie ok. 5 ml krwi [7]. W pozostałych przypadkach krew do badań koagulologicznych powinna być pobierana jako druga probówka, chociaż z powodu braku badań porównawczych nie jest to wymaganie obligatoryjne. Po pobraniu, krew należy niezwłocznie wymieszać. Wystarczające jest 5-6 krotne, łagodne odwrócenie probówki o 180°. Probówek nie wolno wytrząsać [22, 23].

### **Pojemnik na próbkę – materiał, antykoagulant**

Zgodnie z aktualnymi przepisami obowiązują zamknięte systemy to pobierania krwi. Probówki stosowane do badań koagulologicznych są wykonane z tworzywa sztucznego (polipropylen), nie aktywującego układu hemostazy. Zaleca się stosowanie probówek specjalnie przeznaczonych do badań koagulologicznych (producent powinien dostarczyć stosowną informację). Należy stosować wodny roztwór cytrynianu sodu o stężeniu od 105 do 109 mmol/l (3,13% do 3,2%). Dopuszcza się stosowanie zarówno buforowanego jak i niebuforowanego roztworu cytrynianu. Krew do antykoagulantu pobiera się w stosunku 9:1. Stosowany może być również 3,2% buforowany cytrynian w mieszaninie z teofiliną, adenozyzną i dipirydamolem (CTAD), co stabilizuje płytki i blokuje reakcję uwalniania płytkowego. Dopuszcza się probówki zawierające 129 mM cytrynian sodowy (3,8%) w badaniach funkcji płytek krwi w analizatorze PFA-100/200. Dla osób z hematokrytem >55% należy przygotowywać „indywidualne” probówki, stosując odpowiedni wzór do obliczania właściwej objętości cytrynianu (C) [18, 22, 23]:

$$C = \text{objętość krwi} \times (1,85 \times 10^3) \times (100 - \text{Ht})$$

przy czym: C – objętość cytrynianu, Ht - hematokryt

### **Makroskopowa ocena jakości dostarczonego materiału**

Ze względu na zasadniczy wpływ pobrania krwi na wyniki badań koagulologicznych, wskazana jest ocena jakości próbki. Przed odwirowaniem krwi należy sprawdzić, czy w probówce znajduje się właściwa objętość krwi (niepełnienie lub przepełnienie) oraz powoli obracając probówkę wykluczyć obecność skrzepu na ścianie probówki. W przypadku probówek próżniowych, próbka powinna zostać odrzucona, jeżeli zawiera <90% oczekiwanej objętości [24]. Typowy obraz koagulogramu wykonany w częściowo wykrzepionej krwi to: małopłytkowość, skrócone czasy - protrombinowy i APTT oraz podwyższone stężenie dimeru D (wartości mogą wielokrotnie przekraczać zakres referencyjny).

Ocenie powinno być także poddane osocze. Próbkę z hemolizą oraz niejednorodną (obecność strąków, lipemia) nie nadają się do badań. W niedalekiej przyszłości, dzięki zastosowaniu analizatorów automatycznie oceniających obecność hemolizy czy lipemii, ocena makroskopowa osocza nie będzie już konieczna [4].

### **OPRACOWANIE MATERIAŁU**

Badania przeprowadzane są w osoczu po odwirowaniu krwi w określonych warunkach.

#### **Wirowanie**

- Czas wirowania – zalecany 15 min (niektórzy autorzy dopuszczają czas 5-10 min dla podstawowych testów hemostazy) [24].
- Siła odśrodkowa [g] – 1500 (wyższa - może aktywować płytki oraz powodować hemolizę)
- Temperatura wirowania - pokojowa.

Wskazane jest wirowanie jednokrotne w w/w warunkach, a w sytuacjach szczególnych (np. diagnostyka zespołu antyfosfolipidowego) - dwukrotne. W tym przypadku drugie wirowanie powinno odbywać się przez 10 min, przy sile odśrodkowej >2500 g. Obecnie nie zaleca się stosowania osocza filtrowanego [24]. Proponowane są różne parametry wirowania, ale większość autorów jest zgodna, że końcowym efektem wirowania jest uzyskanie osocza, w którym nie może być więcej płytek niż  $10 \times 10^9/l$ . Warto o tym pamiętać decydując się na stosowanie hamowania w wirówce, ponieważ hamowanie wiąże się ze zwiększeniem liczby płytek w osoczu [25]. W związku z powyższym zaleca się sprawdzenie parametrów wirowania przed dopuszczeniem wirówki do pracy w laboratorium. Z doświadczenia autorów wynika, że wystarczy oznaczyć liczbę płytek krwi po odwirowaniu krwi w trzech próbkach pochodzących od pacjentów „typowych” dla danego laboratorium i trzech - od zdrowych dawców. Podobną procedurę należy wykonać dla próbek przeznaczonych do diagnostyki zespołu antyfosfolipidowego. W tym przypadku liczba płytek nie powinna przekraczać wartości  $1-2 \times 10^9/l$ , a za wartość dopuszczającą do analizy uznaje się liczbę płytek  $<7 \times 10^9/l$  [26].

## PRZECHOWYWANIE MATERIAŁU

### 1. Zalecenia ogólne

Krew należy przechowywać w temp. pokojowej, zawsze w zamkniętych probówkach (bez odwirowania lub po odwirowaniu). Stabilność oznaczanego parametru określana jest dla materiału pozostającego w spoczynku. Przewożenie nieodwirowanej krwi powinno się odbywać zgodnie z obowiązującymi normami prawnymi w szczególności do tego przeznaczonych izotermicznych pojemnikach, w statywach, w pozycji pionowej.

Zgodnie z najnowszymi doniesieniami w piśmiennictwie, dotyczącymi próbek pochodzących od osób zdrowych, przechowywanie krwi do 24 godzin w temperaturze pokojowej lub 4°C nie wpływa na wyniki oznaczeń PT, TT, DD i fibrynogenu [14], natomiast krew na oznaczenia APTT nie może być przechowywana dłużej niż 8 godzin [13]. Dlatego bezpieczniej będzie uznać, że krew po odwirowaniu powinna być przechowywana w temperaturze pokojowej w szczelnie zamkniętych probówkach nie dłużej niż 6 godzin dla krwi pobranej od pacjentów pozostających na leczeniu antagonistami witaminy K [15] oraz nie dłużej niż 4 godziny dla krwi pobranej od pacjentów leczonych niefrakcjonowaną heparyną. Informacja ta jest kluczowa dla postępowania przedanalizy, gdyż w tym przypadku krew musi być odwirowana w ciągu godziny od pobrania [22, 23]. W czasie przechowywania krwi z płytek krwi uwalnia się czynnik antyheparynowy (PF4), który wiążąc heparynę uniemożliwia rzetelną ocenę jej działania za pomocą APTT w próbkach krwi, które nie zostały odwirowane w ciągu godziny.

Nie ma konieczności zlewania i oddzielnego przechowywania osocza. Przechowywanie zamrożonych próbek osocza jest dopuszczalne, ale nie zalecane. Dopuszczalny czas przechowywania zamrożonego materiału jest uzależniony od temperatury (tab. III).

### 2. Zalecenia szczegółowe

W przypadku przechowywania materiału do oznaczeń stężenia dimeru D zastosowanie ma podstawowe zalecenie, czyli 4 godziny przechowywania w temperaturze pokojowej z możliwością wydłużenia tego czasu do 24 godzin w warunkach chłodniczych [27].

Ponieważ aktywność (stężenie) przeciwciał oznacza się zarówno w surowicy jak i osoczu, to dla uproszczenia laboratoryjnej procedury można przyjąć, że wszystkie oznaczenia wykonywane są w osoczu i związku z tym ustalić jednolity czas przechowywania materiału do badań koagulologicznych (tab. III). Najnowsze badania wykazały, że w diagnostyce HIT wyniki badań uzyskanych z osocza nie różniły się od wykonanych z surowicy [28].

Badania czynności płytek krwi są wykonywane sporadycznie, ale warto wiedzieć, że przechowywana może być pełna krew pobrana na cytrynian, nie dłużej niż 4 godziny i jedynie w temperaturze pokojowej (tab. III) [4].

Do badań genetycznych krew pełna pobierana jest wg zaleceń pracowni specjalistycznej. Standardowo wykorzystywane są probówki do badań morfologicznych z wersenianem potasu. Pełną krew można przechowywać wiele dni (np. tydzień) w temperaturze pokojowej lub dłużej (brak szczególnych danych) w warunkach chłodniczych. Na ogół pełna krew jest zamrażana, a jej przydatność do oznaczeń diagnostycznych została potwierdzona przy przechowywaniu do ponad dwóch lat (-70°C) [1].

## TRANSPORT

### 1. Zalecenia ogólne

Transport materiału powinien się dostosowywać do omówionych powyżej warunków przechowywania. Przewożenie nieodwirowanej krwi powinno się odbywać zgodnie z obowiązującymi normami prawnymi w szczególności do tego przeznaczonych izotermicznych pojemnikach, w statywach w pozycji pionowej. Próbkę mrożonego osocza należy przewozić w pojemnikach z suchym lodem. Zgodnie z obowiązującymi przepisami przewożenie materiału do badań laboratoryjnych możliwe jest przez firmy posiadające stosowny certyfikat. Konieczne jest udokumentowane potwierdzenie czasu trwania transportu i temperatury w pojemniku do przewożenia próbek (dotyczy zarówno krwi jak i mrożonego osocza). Rozmrażanie należy przeprowadzać szybko (5-10 min) w 37°C. Po rozmrożeniu należy próbkę delikatnie wymieszać i sprawdzić występowanie precypitatów. W przypadkach wątpliwych można oznaczyć fibrynogen, którego stężenie nie powinno różnić się o więcej niż 20 % od wyniku uzyskanego

Tabela III. Przechowywanie materiału do badań koagulologicznych – podsumowanie

Badanie	pełna krew [godziny]	materiał po odwirowaniu [godziny]	osocze (-20 °C)* [tygodnie]	osocze (-70 °C)* [miesiące]
PT	6	6	bd	bd
APTT	1	4	bd	bd
HIT lub APS** (osocze)	1	4	2	12
Inne (osocze)	4	4	2	12
dimer D	4 (25°C), 12 (4°C)	4 (25°C), 24 (4°C)	2	12

\*nie mniej niż

\*\* osocze super-ubogopłytkowe (podwójne wirowanie)

bd – brak wiarygodnych danych

przed zamrożeniem. Oznaczenie należy wykonać w ciągu 2 godzin. Próbkę niejednorodną nie nadają się do badań.

## 2. Zalecenia szczegółowe

Najwięcej problemów przysparza wysyłanie materiału w celu wykonania badań czynności płytek krwi. Należy zapewnić stałą temperaturę zbliżoną do pokojowej (pojemniki izotermiczne). Badania tego typu są wykonywane rzadko, stąd rzeczywistym problemem jest transport zamrożonych próbek osocza, do którego konieczny jest suchy lód. Transportem zmrożonego materiału powinny się zajmować uprawnione do tego firmy. W przypadku transportu krwi, nie ma aż takich rygorów, należy unikać wstrząsania próbką, gdyż prowadzi to do aktywacji płytek krwi.

Nie ma problemu z przesyłaniem materiału do badań genetycznych, a pozostałe oznaczenia mają ujednoczone wymagania, zgodne z czasem przechowywania materiału (tab. III).

## OPIS SKIEROWANIA

Zalecenia zamieszczone w Zarządzeniu Ministra Zdrowia [17] są w zupełności wystarczające. Warto jednak przypomnieć, że bez wpisanej godziny pobrania (z dokładnością do 5 minut) oraz bez podania danych klinicznych mających wpływ na postępowanie przedanalizyczne, materiał nie może być przyjęty do laboratorium.

Powszechnie wiadomo, że wymagany w Zarządzeniu Ministra Zdrowia „opis kliniczny” jest powszechnie ignorowany przez jednostki zlecające wykonanie badania.

Skierowanie na badania koagulologiczne musi zawierać następujące informacje kliniczne o pacjencie:

- rodzaj zaburzeń hemostazy (podejrzenie),
- zastosowane leki wpływające na wyniki oznaczeń,
- sposób pobrania krwi (bezpośrednie wkłucie, pobranie ze stałego dościa)

Bez wyżej wymienionych danych nie jest możliwe zapewnienie jakości fazy przedanalizycznej.

## PODSUMOWANIE

Zalecenia uzgodnione w czasie prac Sekcji Laboratoryjnej Diagnostyki Hemostazy Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej opierają się zasadniczo na rozporządzeniu Ministra z dnia 21 stycznia 2009 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [17], na dokumencie H21-A5 Clinical and Laboratory Standards Institute [1] oraz na wytycznych Brytyjskiego Komitetu ds. Standaryzacji w Hematologii (BCSH; *British Committee for Standards in Haematology*) [23].

Przedstawiony w pracy opis postępowania przedanalizycznego jest koniecznym kompromisem pomiędzy informacjami dostępnymi w polskim i anglojęzycznym piśmiennictwie [2, 3, 13-15, 23, 29, 30] a także z wytycznymi CLSI [1, 31] i BCSH [23].

Najtrudniej jest wskazać czas przechowywania materiału do

oznaczania czasu protrombinowego. Uznano, że w polskich warunkach bardziej właściwe będzie przyjęcie 6 godzin jako maksymalnego czasu przechowywania materiału [15]. Kompromis jest konieczny ponieważ, z jednej strony wytyczne CLSI i część autorów [1, 13, 14] dopuszczają 24 godzinne przechowywanie materiału, a z drugiej, praktyczne przewodniki dla pracowników laboratoriów, zalecają przechowywanie materiału nie dłużej niż 4 godziny [13, 14, 18, 23]. Skąd tak wielkie rozbieżności w zaleceniach? W materiale uzyskanym od zdrowych osób lub pacjentów nie leczonych przeciwzakrzepowo stabilność parametrów jest znacznie wyższa niż w grupie przyjmującej leki przeciwkrzepliwne. Dodatkowo należy pamiętać, że standardowo dopuszczalna jest zmiana wartości PT w czasie przechowywania, sięgająca do 10%. Sugerowane w niniejszej publikacji 6 godzinne przechowywanie materiału przeznaczonego do oznaczeń PT jest uzasadnione wynikami wcześniejszych badań [15] oraz ułatwi transport krwi z punktów pobrania do centralnego laboratorium.

Z kolei, zaproponowany 4 godzinny czas przechowywania materiału w odniesieniu pozostałych badań (w tym oznaczenia liczby i oceny czynności płytek krwi) jest zgodny z dokumentem CLSI [1] i wytycznymi BCSH [23].

Kolejnym „odstępstwem” od danych dostępnych w piśmiennictwie jest długi czas przechowywania krwi, dotyczący oznaczenia stężenia dimeru D (12 godzin w temp. 4°C), a także surowicy do oznaczeń przeciwciał (8 godzin). W przypadku dimeru D wytyczne CLSI zezwalają na przechowywanie materiału nawet powyżej 24 godzin [31]. Uwzględniając jednak specyfikę oznaczeń tego parametru (np. postępująca w czasie proteoliza) oraz na podstawie dostępnych publikacji [27] uznano za zasadne przyjęcie dopuszczalnego czasu przechowywania: dla temp. pokojowej - 4 godziny, a dla temperatury 2-5°C - 12 godzin.

W celu łatwego zapamiętania powyższych zaleceń, można zaproponować wprowadzenie schematu „4” (większość oznaczeń) – „6” (PT) – „12” (DD; 2-5°C) jako prostej formuły opracowywania materiału do badań koagulologicznych.

Druga część formuły dotyczy przechowywania materiału w stanie zamrożenia.

Mrożenie osocza związane jest z ryzykiem wydłużenia czasów przy oznaczaniu PT i APTT [32]. Dlatego zaleca się wykonywanie oznaczeń ze świeżego materiału, a w sytuacji braku możliwości wykonania oznaczeń w czasie opisanym w pierwszej formule, dopuszcza się w wyjątkowych przypadkach mrożenie materiału według schematu: 2 tygodnie (-20°C) – 12 miesięcy (<-70°C). Część autorów dopuszcza przechowywanie materiału w głębokim zamrożeniu nawet przez 3 lata [33], ale w codziennej praktyce laboratoryjnej powinno wystarczyć 12 miesięcy.

Przyjęcie wysokich wymagań daje większą szansę zapewnienia jakości, a ich liberalizacja będzie możliwa po wprowadzeniu pełnej kontroli i nadzoru specjalistycznego nad laboratoryjną diagnostyką hemostazy. Otwarta pozostaje kwestia trybu i zmiany wytycznych na mniej rygorystyczne.

Uważamy, że po ukazaniu się nowego dokumentu CLSI oraz zebraniu opinii diagnostów laboratoryjnych i klinicystów zostanie opracowana kolejna wersja wytycznych.

### Piśmiennictwo

1. Adcock DM. 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. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008; 28(5).
2. Adcock DM. Sample integrity and preanalytical variables, Quality in laboratory hemostasis and thrombosis. Edited by Kitchen S, Olson JD, Preston FE. Oxford, Wiley-Blackwell, 2009.
3. Bennett ST. Collection of coagulation specimens, Laboratory hemostasis. A practical guide for pathologists. Edited by Bennett ST, Lehman CM, Rodgers GM. New York, Springer Science+Business Media, LLC, 2007.
4. Lippi G, Becan-McBride K, Behulova D, et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(1): 229-241.
5. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of two different buffered sodium citrate concentrations on coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16(5): 381-383.
6. Bowen RA, Hortin GL, Csako G, et al. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clin Biochem* 2010; 43(1-2): 4-25.
7. Favaloro EJ, Lippi G, Raijmakers MT, et al. Discard tubes are sometimes necessary when drawing samples for hemostasis. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134(5): 851.
8. Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Lippi G, et al. Elimination of the venous stasis error for routine coagulation testing by transillumination. *Clin Chim Acta.* 2011; 412(15-16): 1482-1484.
9. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16(6): 453-458.
10. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17(7): 557-561.
11. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, et al. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009; 31(4): 462-467.
12. Zurcher M, Sulzer I, Barizzi G, et al. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008; 99(2): 416-426.
13. Zhao Y, Lv G. Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(5): 566-570.
14. Feng L, Zhao Y, Zhao H, et al. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014; 4:3868. doi: 10.1038/srep03868.3868.
15. Van Geest-Daalderop JH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJ, et al. Preanalytical variables and off-site blood collection: influences on the results of the prothrombin time/international normalized ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy. *Clin Chem* 2005; 51(3): 561-568.
16. Christensen TD, Jensen C, Larsen TB, et al. International Normalized Ratio (INR), coagulation factor activities and calibrated automated thrombin generation - influence of 24 h storage at ambient temperature. *Int J Lab Hematol* 2010; 32(2): 206-214.
17. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. Dz.U. 2009 nr 22 poz. 128.
18. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, et al. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 565-575.
19. Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice. *Clin Chem* 2011; 57(9): 1256-1262.
20. Knol HM, Kemperman RF, Kluin-Nelemans HC, et al. Haemostatic variables during normal menstrual cycle. A systematic review. *Thromb Haemost* 2012; 107(1): 22-29.
21. Smock KJ, Crist RA, Hansen SJ, et al. Discard tubes are not necessary when drawing samples for specialized coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21(3): 279-282.
22. Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 576-585.
23. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, et al. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2012; 35(1): 1-13.
24. Preston FE, Lippi G, Favaloro EJ, et al. Quality issues in laboratory haemostasis. *Haemophilia* 2010; 16 Suppl 5: 93-99.
25. Daves M, Giacomuzzi K, Tagnin E, et al. Influence of centrifuge brake on residual platelet count and routine coagulation tests in citrated plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; 25: DOI:10.1097/MBC.0000000000000026.
26. Ortel TL. Laboratory diagnosis of the lupus anticoagulant. *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14(1): 64-70.
27. Bohm-Weigert M, Wissel T, Muth H, et al. Long- and short-term in vitro D-dimer stability measured with INNOVANCE D-Dimer. *Thromb Haemost* 2010; 103(2): 461-465.
28. Kolde HJ, Habrecht U, von HJ, et al. Multicentric validation of a rapid assay for heparin-induced thrombocytopenia with different specimen types. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014; 25(1): 6-9.
29. Raszeja-Specht A. Zapewnienie jakości w laboratorium koagulologicznym, w: Diagnostyka laboratoryjna w hemostazie. Jastrzebska M. (red.), Oinpharma, Warszawa 2009; 324-335.
30. Raszeja-Specht A. Metody badań układu hemostazy, w: Diagnostyka laboratoryjna w hemostazie. Jastrzebska M. (red.), Oinpharma, Warszawa 2009: 92-136
31. Olson JD. Quantitative D-dimer for the Exclusion of Venous Thromboembolic Disease; Proposed Guideline, CLSI document H59-A. Clinical and Laboratory Standards Institute 2011; 31(6).
32. Alesci S, Borggreffe M, Dempfle CE. Effect of freezing method and storage at -20 degrees C and -70 degrees C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Thromb Res* 2009; 124(1): 121-126.
33. Van Den Besselaar AM, Witteveen E, van der Meer FJ. Long-term stability of frozen pooled plasmas stored at -70 degrees C, -40 degrees C, and -20 degrees C for prothrombin time and International Normalized Ratio (INR) assessment. *Thromb Res* 2013; 131(4): 349-351.