

Oznaczanie aktywności antykoagulacyjnej bezpośrednich doustnych antykoagulantów – aktualny stan wiedzy i doświadczenia własne laboratorium

Determination of anticoagulant activity of direct oral anticoagulants: the current state of knowledge and a single center experience

Tadeusz Góralczyk¹, Anetta Undas²

¹Laboratorium Analityczne, ²Instytut Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego KSS im. Jana Pawła II w Krakowie

Streszczenie

Bezpośrednie doustne antykoagulanty (BDA) coraz powszechniej zastępują antagonistów witaminy K w leczeniu i zapobieganiu żyłnej chorobie zakrzepowo-zatorowej oraz profilaktyce udaru mózgu w niezastawkowym migotaniu przedsionków. Przewidywalny mechanizm farmakologiczny, brak ograniczeń w diecie oraz brak interakcji z większością leków nie wymusza rutynowego laboratoryjnego monitorowania terapii przy zastosowaniu BDA. Jednak w przypadku podejrzenia stężeń wykraczających poza oczekiwany zakres lub potrzeby wykonania pilnego zabiegu chirurgicznego konieczny jest dostęp do metod umożliwiających wiarygodne oznaczenie BDA. W rutynowym laboratorium efekt antykoagulacyjny dabigatranu można oznaczać metodami wykorzystującymi ekarynę lub opartymi o modyfikację czasu trombinowego. Rywaroksaban, apiksaban i edoksaban mogą być oznaczane chromogennymi metodami za pomocą pomiaru aktywności anty-FXa. Własne (najdłuższe w Polsce) doświadczenia laboratorium Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II z całodobową dostępnością oceny poziomu BDA obejmują oznaczenia dabigatranu (n=136), rywaroksabanu (n=374) i apiksabanu (n=22) u pacjentów ambulatoryjnych i hospitalizowanych od maja 2013 roku do kwietnia 2017 roku. Oznaczanie poziomu BDA powinno być dostępne w systemie 24/7 w wysokospecjalistycznych placówkach, zwłaszcza wykonujących zabiegi w trybie nagłym, leczących chorych z ostrym udarem mózgu i krwotokami.

Summary:

Direct oral anticoagulants (DOACs) increasingly replace vitamin K antagonists in the treatment and prevention of venous thromboembolism, and stroke prevention in non-valvular atrial fibrillation. Due to their predictable pharmacological mechanism, no diet restrictions and lack of interaction with most drugs, DOACs do not require routine laboratory monitoring. However, in cases of suspected concentrations beyond the expected range or a need for an emergent surgical procedure, access to laboratory methods for reliable DOACs determination is necessary. In a routine laboratory, the anticoagulant effect of dabigatran can be determined using methods based on ecarin or the modified dilute thrombin time. Rivaroxaban, apixaban and edoxaban may be measured using the chromogenic anti-FXa assays. Our own experience (the longest in Poland) from the John Paul II Hospital laboratory with the 24-hour availability of DOACs measurement involves determinations of dabigatran (n = 136), rivaroxaban (n = 374) and apixaban (n = 22) in outpatients and hospitalized patients between May 2013 and April 2017. Determination of the level of DOACs should be available 24/7 in highly specialized medical centers, especially in those which perform emergency procedures for treating patients with acute stroke and hemorrhages.

Słowa kluczowe: bezpośrednie doustne antykoagulanty, apiksaban, dabigatran, edoksaban, rywaroksaban

Key words: direct oral anticoagulants, apixaban, dabigatran, edoxaban, rivaroxaban

Wstęp

Bezpośrednie doustne antykoagulanty (BDA) to leki blokujące, bez pośrednictwa antytrombiny, trombinę lub aktywny czynnik X (FXa) [1]. W publikacjach anglojęzycznych są najczęściej określane jako „direct oral anticoagulants” (DOACs) lub „non-vitamin K an-

tagonist oral anticoagulants” (NOACs). Obecnie 30-60% chorych przyjmuje już BDA w profilaktyce udaru mózgu i zatorowości obwodowej, leczeniu i profilaktyce żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ). Bardzo rzadko BDA stosuje się obecnie w Polsce w prewencji żylnych powikłań zatorowo-zakrzepowych

u pacjentów po zabiegach alopastyki stawu kolanowego lub biodrowego.

Celem pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat metod oznaczania BDA oraz wskazań do wykonywania takich oznaczeń, jak również własnych doświadczeń związanych z pomiarem stężeń tych leków w rutynowej pracy laboratorium szpitalnego.

Bezpośrednie doustne antykoagulanty (BDA)

Bezpieczeństwo i skuteczność

Badania kliniczne wykazały, że BDA cechują się podobną skutecznością jak antykoagulanty doustne będące antagonistami witaminy K (VKAs; *vitamin K antagonists*), jednak mniejszym ryzykiem krwawień [2 – 5]. Metaanaliza 12 badań obejmujących pacjentów z migotaniem przedsionków (n=77 011) wykazała zmniejszenie udarów i układowych zdarzeń zakrzepowych (odds ratio {OR} 0,85; 95%; confidence interval {CI} 0,75 – 0,98), 52% redukcję krwawień śródczaszkowych (OR 0,48; CI 0,40 – 0,57) i 14% redukcję śmiertelności (OR 0,86; CI 0,82 – 0,91) [6]. Z kolei metaanaliza 7 randomizowanych badań klinicznych (n=29 789) i 1 badania obserwacyjnego (n=4 768) wśród pacjentów z ŻChZZ, wykazała, że ryzyko nawracających epizodów ŻChZZ, śmiertelnych przypadków zatorowości płucnej (ZP), czy występowania zakrzepicy żył głębokich (ZŻG) lub ZP przy stosowaniu BDA, jest porównywalne jak w leczeniu VKAs. Natomiast w tych 7 randomizowanych badaniach klinicznych stwierdzono obniżone ryzyko (od 32% do 69%) dużych krwawień dla dabigatranu, rywaroksabanu i apiksabanu w porównaniu do VKAs [7]. Co ważne, w porównaniu z warfaryną, BDA zmniejszają średnio o 50% ryzyko krwawień wewnątrzczaszkowych (rzadkiego powikłania antykoagulacji, ale obciążonego sięgającą 50% śmiertelnością) [8].

BDA vs. VKAs i HDCz

Szybki wzrost liczby pacjentów przyjmujących BDA wiąże się z ich korzystnymi cechami w porównaniu do standardowych antykoagulantów wykorzystywanych w leczeniu ŻChZZ. Przewagą BDA w stosunku do heparyn drobnocząsteczkowych (HDCz) jest doustne podawanie leku oraz jego syntetyczne pochodzenie, co zmniejsza ryzyko reakcji alergicznych oraz ryzyko trombocytopenii indukowanej heparyną (HIT) [9]. Przewidywalny mechanizm farmakologiczny, brak ograniczeń w diecie oraz brak interakcji z większością leków nie wymusza monitorowania stopnia antykoagulacji ani indywidualnego dopasowywania dawki BDA, co jest niezbędne w przypadku stosowania VKAs [1, 9, 10].

Działanie VKAs polega na zakłócaniu metabolizmu witaminy K poprzez blokowanie tworzenia jej formy hydrochinonowej niezbędnej do produkcji czynników krzepnięcia (II, VII, IX i X) [11]. Terapia z użyciem VKAs wiąże się z koniecznością regularnego monitorowania antykoagulacji za pomocą czasu protrombinowego (PT) wyrażonego w postaci międzynarodowego współczynnika znormalizowanego (INR; *international normalized ratio*) [12]. Dla większości wskazań zakres terapeutyczny mieści się między 2,0 a 3,0 INR [13].

Podstawowe cechy

Podstawową charakterystykę BDA przedstawia tabela I. Cechą wyróżniającą BDA spośród innych antykoagulantów jest selektywny i bezpośredni sposób ich działania na osoczowe czynniki krzepnięcia. Rywaroksaban, apiksaban i edoksaban są bezpośrednimi (nie wymagającymi obecności antytrombiny) inhibitorami FXa, a dabigatran jest bezpośrednim inhibitorem trombiny (FIIa). BDA bardzo szybko osiągają maksymalne stężenie („peak”) we krwi. W zależności od rodzaju BDA najwyższe poziomy notuje się

Tabela I. Charakterystyka bezpośrednich doustnych antykoagulantów (BDA) [29 – 32].

	Dabigatran	Rywaroksaban	Apiksaban	Edoksaban
Nazwa handlowa	Pradaxa	Xarelto	Eliquis	Lixiana
Hamowanie aktywności czynnika krzepnięcia	FIIa	FXa	FXa	FXa
Czas uzyskania maksymalnego stężenia	0,5 – 2,0 h	2 – 4 h	3 – 4 h	1 – 2 h
Czas półtrwania	12 – 14 h	5 – 9 h (młodzi) 11 – 13 h (starsi)	~12 h	10 – 14 h
Eliminacja przez nerki	85 %	66 % (w tym połowa w formie niezmienionej)	27 %	50 %
Główne szlaki metabolizmu/eliminacji	P-gp	CYP3A4, CYP2J2, P-gp, Bcrp	CYP3A4/5, P-gp, Bcrp	Karboksylesteraza 1, CYP3A4/5, P-gp
Podstawowe dawkowanie w MP	2 x 150 mg	1 x 20 mg	2 x 5 mg	1 x 60 mg
Podstawowe dzienne dawkowanie w leczeniu ŻŻG i ZP	Antykoagulacja pozajelitowa przez co najmniej 5 dni, potem 2 x 150 mg	2 x 15 mg przez 3 tygodnie, następnie 1 x 20 mg	2 x 10 mg przez 7 dni, potem 2 x 5 mg	Antykoagulacja pozajelitowa przez co najmniej 5 dni, potem 1 x 60 mg
Wartości referencyjne wyznaczone w badaniach farmakokinetycznych [34]				
Dawka	2 x 150 mg	1 x 20 mg	2 x 5 mg	1 x 60 mg
Mediana w szczycie (5-95 percentyl) [ng/ml]	184 (64-443)	270 (189-419)	171 (91-321)	170 (120-250) ¹
Mediana przed kolejną dawką (5-95 percentyl) [ng/ml]	90 (31-225)	26 (6-87)	103 (41-230)	22 (10-40) ¹

¹ – 25-75 percentyl; Bcrp – breast cancer resistance protein, MP – migotanie przedsionków, P-gp – glikoproteina P, ZP – zatorowość płucna, ŻŻG – zakrzepica żył głębokich.

w czasie 0,5 – 4 godzin po podaniu leku. Czas półtrwania wynosi od 5 do 15 godzin [14]. Minimalne stężenia („trough”), przed kolejną dawką leku, osiąga się po około 12 lub 24 godzinach od poprzedniej (w zależności od dawkowania raz lub dwa razy dziennie). Pogorszenie funkcji nerek (klirens kreatyniny poniżej 50 ml/min) może przyczynić się do dłuższego utrzymywania się wysokich stężeń BDA we krwi, zwłaszcza w przypadku dabigatranu [15]. Natomiast przerwanie terapii, pominięcie kilku dawek leku, zwiększa ryzyko incydentu zakrzepowo-zatorowego.

Wskazania do oznaczania

Zaletą BDA jest brak konieczności rutynowego monitorowania antykoagulacji z uwagi na szerokie okienko terapeutyczne [16]. Jednak są okoliczności, w których znajomość rzeczywistego poziomu BDA może być niezbędna. Materiałem do badań stężeń BDA u pacjentów jest najczęściej standardowe 3,2% (0,109 mol/l) osocze cytrynianowe. Odwirowane osocze (15 min, 2 500 g) jest stabilne w temperaturze pokojowej przez kilka godzin, a zamrożone (poniżej -20° C) przez kilka miesięcy [17]. Wykonywano także pomiary BDA w surowicy i w moczu [18]. Wskazaniem do oznaczenia może być podejrzenie występowania zbyt wysokich lub zbyt niskich stężeń BDA. Stężenia BDA niższe od oczekiwanych mogą występować u pacjentów otyłych (>110 kg), w razie niepowodzenia leczenia (nawracające epizody zakrzepowe), przy zaburzeniach wchłaniania. Zbyt wysokie poziomy BDA można oczekiwać u pacjentów z małą masą ciała (<50 kg), niewydolnością nerek, przy wystąpieniu krwawienia, w podeszłym wieku, przedawkowaniu leku [13, 19]. Interakcja z innymi lekami jest nieistotna z wyjątkiem kilku preparatów przeciwwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych, których metabolizm przebiega tymi samymi szlakami (CYP3A4, P-gp) co metabolizm BDA. Blokada lub stymulacja wspólnych szlaków metabolizmu może doprowadzić do szybszego kumulowania lub eliminacji BDA z organizmu [1]. Pomiar BDA w próbce pobranej w okresie „peak” może być przydatny do wykrywania przedawkowania, a w próbce z okresu „through” przy podejrzeniu kumulowania się leku u pacjenta z obniżoną funkcją nerek lub wątroby [17]. Wskazaniem do szybkiego oznaczenia stężenia BDA może być uraz, pilny zabieg chirurgiczny, czy terapia fibrynolityczna w ostrym udarze niedokrwiennym [13, 19, 20]. Możliwe wskazania do oznaczania stężenia BDA zawarto w tabeli II.

Jeszcze niedawno nie było żadnego antidotum odwracającego antykoagulacyjne działanie BDA. Jednak od 2016 roku jako antidotum dla dabigatranu może być stosowany powszechnie dostępny

idarucizumab, chimeryczne przeciwciało podawane dożylnie [21]. W III fazie badań klinicznych jest andexanet alfa, który hamuje aktywność inhibitorów FXa [21, 22] oraz trwają mniej zaawansowane badania nad ciraparantagiem działającym zarówno na inhibitory FXa, jak i FIIa oraz na HDCz [23].

W propozycjach dotyczących postępowania okołooperacyjnego z pacjentami w trakcie terapii BDA są zalecenia opóźniania (jeżeli to możliwe) operacji o czas będący wielokrotnością czasu półtrwania stosowanego leku przy uwzględnieniu ryzyka krwawień, funkcji nerek i innych przyjmowanych leków [24]. Jako bezpieczne stężenie BDA dla przeprowadzenia zabiegu chirurgicznego podaje się wartości <30 ng/ml [25]. Przy wyższych stężeniach stosuje się odpowiednie procedury ograniczania działania BDA, w tym podawanie antidotum w przypadku dabigatranu. Z uwagi na ewentualne skutki uboczne, a także wysoką cenę antidotum, celowe jest, aby była możliwość szybkiego i wiarygodnego zmierzenia stężenia BDA we krwi pacjenta [20, 26]. Z niewielu dotychczas publikowanych doniesień wynika, że w codziennej praktyce najczęstszą przyczyną pomiaru stężeń BDA u pacjentów ambulatoryjnych jest ekstremalna masa ciała, incydent zakrzepowy lub krwawienie, a u pacjentów hospitalizowanych pilna interwencja chirurgiczna [27, 28].

Zakresy referencyjne

Dla BDA nie ma wyznaczonych optymalnych zakresów stężeń. Charakterystyki produktów leczniczych podają wartości uzyskiwane w badanych populacjach dla określonych dawek i wyszczególnionych wskazań [29-32]. W publikacjach podawane są zakresy stężeń (najczęściej centralne 90-95%) występujące w populacjach pacjentów leczonych BDA i określa się je jako „on-therapy range” („zakres w trakcie leczenia”) [33]. Taki zakres stężeń „w trakcie leczenia” zawiera się między 5 percentylem dla stężeń występujących przed kolejną dawką, a 95 percentylem stężeń spotykanych w szczycie dla danego DOAC podawanego w określonej dawce [34]. Z uwagi na stosunkowo szybko zmieniające się stężenia BDA w ciągu doby (wzrost po podaniu leku i krótki okres półtrwania), do właściwej interpretacji wyniku potrzebna jest znajomość czasu, jaki upłynął od podania ostatniej dawki.

Metody oznaczania

Metodą referencyjną do oznaczania stężenia BDA w osoczu jest chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS; *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) [35, 36]. LC-MS/MS była stosowana w większości badań

Tabela II. Wskazania do oznaczania stężenia bezpośrednich doustnych antykoagulantów (BDA) [13, 14, 19].

Stężenia BDA poza oczekiwanym zakresem		Inne wskazania
poniżej	powyżej	
Duża masa ciała (>110 kg)	Mała masa ciała (<50 kg)	Pilny zabieg chirurgiczny Uraz Terapia fibrynolityczna Podanie antidotum Zmiana stosowanego antykoagulantu
Nawracające epizody zakrzepowe	Niewydolność nerek	
Zaburzenia wchłaniania	Niewydolność wątroby	
Interakcja z lekami	Krwawienia	
	Podeszły wiek	
	Przedawkowanie BDA	
	Interakcja z lekami	

klinicznych nad BDA do pomiarów farmakokinetycznych [17]. Limit detekcji (LOD) wynosi od poniżej 1 do 3 ng/ml [14, 37, 38]. Dla stężenia 50 ng/ml nieprecyzja pomiarów BDA w serii wynosiła 3,5 – 6,4%, a między seriami 2,8 – 9,5%. [38]. Jest to jednak metoda złożona, czasochłonna, wymagająca specjalistycznego wyposażenia i dlatego niedostępna w większości laboratoriów [17]. Są jednak modyfikacje LC-MS/MS, które umożliwiają pomiar apiksabanu, czy dabigatranu w czasie krótszym niż 10 minut łącznie z przygotowaniem próbki [39]. Przydatne może być urządzenie LC-MS/MS mierzące jednocześnie cztery różne BDA w przypadku, kiedy nieznan jest rodzaj stosowanego przez pacjenta antykoagulantu lub możliwa jest obecność kilku leków w próbce [40]. Obecnie w rutynowych laboratoriach testami z wyboru do oznaczania BDA w osoczu są tzw. „specific coagulation tests”. Do nich należą testy oparte o rozcieńczony czas trombinowy (dTT; *diluted thrombin time*), ekarynę (ECT; *ecarin clotting time*, ECA; *ecarin chromogenic assay*) lub pomiar chromogenny z wykorzystaniem trombiny w przypadku oznaczania dabigatranu oraz testy chromogenne mierzące aktywność anty-FXa w przypadku pomiarów rywaroksabanu, apiksabanu lub edoksabanu [35, 36, 41]. Testy te mogą być zaadoptowane na rutynowo używane automatyczne analizatory koagulologiczne. Zastosowane w tych testach kalibratory mają wyznaczone stężenia BDA w przy użyciu metod LC-MS/MS. LOD na poziomie 10-30 ng/ml ogranicza ich przydatność do dokładnego pomiaru stężeń BDA poniżej 30 ng/ml [14, 37, 42], chociaż dla testu Biophen DiXal anti-Xa w jednej z prac podano wartość LOD wynoszącą tylko 2,8 ng/ml [38]. Dla rywaroksabanu w stężeniu 82 ng/ml notowano nieprecyzję pomiarów w serii 1,5 – 6,4%, a między seriami 3,5 – 12,6% (w zależności od metody) [38]. Dla dabigatranu w stężeniu 92 ng/ml notowano nieprecyzję pomiarów w serii 3,7 – 8,3%, a między seriami 9,9 – 33,0% (w zależności od metody) [38]. Testy te, mimo określenia „specific”, nie są całkowicie swoiste wobec leku, którego stężenie powinny oznaczać. Test Hemoclot Thrombin Inhibitors (Hyphen BioMed, Neuville-Sur-Oise, Francja) będący modyfikacją dTT, stosowany do mierzenia stężeń dabigatranu jest wrażliwy także na heparynę i inne inhibitory trombiny (np. hirudynę) [43]. Ich obecność w badanej próbce może przedłużać czas krzepnięcia, co skutkuje fałszywie zawyżonymi wynikami pomiarów stężenia dabigatranu. Testy przeznaczone do pomiarów inhibitorów FXa nie rozróżniają leków będących bezpośrednimi inhibitorami FXa. To znaczy, że wykonując pomiar testem skalibrowanym na rywaroksaban, fałszywie wykaże się jego obecność w próbce zawierającej inny bezpośredni inhibitor FXa, np. apiksaban.

W przypadku braku testów skalibrowanych na BDA przydatne są testy mierzące aktywność anty-FXa stosowane do wykazywania obecności heparyny niefrakcjonowanej (HNF) lub HDCz. Wynik ujemny takiego testu świadczy o tym, że w badanej próbce nie może znajdować się bezpośredni inhibitor FXa w stężeniu wyższym niż 25-30 ng/ml. Z kolei prawidłowy czas trombinowy (TT) wyklucza obecność dabigatranu w próbce [21].

Na obecność BDA w osoczu mogą wskazywać przedłużone czasy rutynowych testów krzepnięcia tj. PT i aktywowanego czasu częściowej tromboplastyny (APTT). Jednak trzeba wiedzieć, że przedłużenie PT lub APTT jest zależne od rodzaju leku i jego stężenia

w próbce [44]. Generalnie APTT jest bardziej czuły na dabigatran, a PT na rywaroksaban, apixaban i edoxaban [19]. Jednak czułość różnych odczynników do PT i APTT na poszczególne BDA jest inna. Większość odczynników do PT jest mniej czuła na apiksaban, niż na rywaroksaban i edoksaban [34]. Tak więc, aby szacować nawet tzw. „względny stopień antykoagulacji” należy wiedzieć, jakie stężenie określonego leku z grupy BDA może przedłużać PT lub APTT wykonywane przy zastosowaniu konkretnych odczynników i analizatora [35]. W tym celu laboratorium powinno przeprowadzić pomiary PT lub APTT próbek zawierających określony rodzaj BDA w różnych stężeniach korzystając z używanych przez siebie odczynników i analizatora. Jednak wykazano, że PT i APTT próbek obciążanych dabigatranem i rywaroksabanem („in vitro”) są bardziej przedłużone niż w przypadku próbek pacjentów zawierających podobne stężenia tych antykoagulantów. Grozi to niedoszacowaniem stężeń BDA w próbkach pacjentów [45]. Niedawno opublikowane badanie pokazało, że rozbieżności między odpowiedzią PT i APTT na obecność BDA w próbce, a wynikami specyficznych testów sięgają 62% [46]. Opieranie się tylko na wynikach PT lub APTT może prowadzić do błędnych interpretacji stopnia antykoagulacji pacjentów leczonych BDA. Wyników PT otrzymanych u pacjentów leczonych BDA nie można wyrażać w INR, gdyż ten wskaźnik jest oparty na czułości odczynników względem tradycyjnych VKAs [13].

Z uwagi na potrzebę wykonywania oznaczeń BDA w trybie pilnym dla pojedynczych próbek, próbuje się wykorzystać do tego celu istniejące urządzenia i metody badań przyłóżkowych (POCT; *point of care testing*). Nie są dostępne urządzenia lub testy POCT specyficzne dla BDA. Urządzenia POCT mogą być wykorzystywane do szacowania efektu antykoagulacyjnego lub szybkiego identyfikowania stężeń BDA istotnych z punktu widzenia bezpiecznego przeprowadzania procedur chirurgicznych (<30 ng/ml dla rywaroksabanu i dabigatranu) lub leczenia trombolitycznego (<50 ng/ml dla rywaroksabanu i <100 ng/ml dla dabigatranu) [47, 48]. Różne BDA wykazują różny efekt na POCT zależny od metody [49]. Przy pomocy CoaguCheck (Roche, Basel, Szwajcaria) przeznaczonego do monitorowania leczenia VKAs można wskazać stężenia rywaroksabanu <32 i <100 ng/ml ze swoistością odpowiednio 90% i 96%, ale nie można tego zrobić dla dabigatranu lub apiksabanu [50]. Stężenia dabigatranu poniżej 30 ng/ml z ponad 95% swoistością można wykryć urządzeniem Hemochron Signature (ITC, Edison, NJ, USA) stosując odpowiednio zestawy do pomiaru PT/INR i ACT [47]. Wraz z wzrastającymi stężeniami rywaroksabanu przedłużaniu ulegają parametry krzepnięciaowe (R i K) w badaniu tromboelastograficznym (TEG) [51]. Metodą tromboelastometryczną (ROTEM) można wykrywać działanie apiksabanu, co jest praktycznie niemożliwe w przypadku testów globalnych [48]. Korelacja wyników aktywowanego czasu krzepnięcia (ACT; *activated clotting time*) i chromogennych testów anty-FXa jest umiarkowana (R^2 od 0,45 do 0,62) i nie może być akceptowana w klinicznej praktyce [52]. Badana jest przydatność testów paskowych do wykrywania BDA w moczu [18].

W Laboratorium Analitycznym Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II zaczęto rutynowo oznaczać stężenia dabigatranu i rywaroksabanu w maju 2013 roku, a apiksabanu

we wrześniu 2016 roku. Pomiary przeprowadzono korzystając z komercyjnie dostępnych odczynników, kalibratorów i kontroli firmy Hyphen BioMed (Neuville-Sur-Oise, Francja) i analizatora koagulologicznego BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Niemcy). W 2014 roku opublikowaliśmy pierwsze polskie własne doświadczenia z oznaczaniem dabigatranu i rywaroksabanu we krwi pacjentów [53, 54]. W kolejnych latach przedstawiliśmy prace nad interferencją rywaroksabanu w wybranych badaniach laboratoryjnych [55-57] oraz stosowaniem BDA u pacjentów z trombofilią lub zespołem antyfosfolipidowym [58-60].

Do oznaczania stężenia rywaroksabanu i apiksabanu używano zestaw Biophen DiXal, w którym zastosowano dwustopniową metodę chromogenną mierzącą aktywność anty-FXa. Stosowane w zestawie odczynniki inaktywują antytrombinę obecną w próbce [17]. Dlatego test ten jest niewrażliwy na interferencje ze strony pośrednich inhibitorów FXa takich jak HNF, HDCz czy fondaparynuks. Do przygotowania krzywej kalibracyjnej dla rywaroksabanu używano zestaw kalibratorów (0, ~250 i ~500 ng/ml) Biophen Rivaroxaban Plasma Calibrator. Do przygotowania krzywej kalibracyjnej dla apiksabanu używano zestaw kalibratorów (0, ~300 i ~600 ng/ml) Biophen Apixaban Calibrator, a także zestaw kalibratorów (0, ~50 i ~100 ng/ml) Biophen Apixaban Calibrator Low dla stężeń poniżej 100 ng/ml.

Do oznaczania stężenia dabigatranu używano zestaw Hemoclot Thrombin Inhibitors, w którym zastosowano metodę krzepnięcia opartą o modyfikację czasu trombinowego. Test jest wrażliwy na obecność heparyny i innych inhibitorów trombiny. Mogą one przedłużać czas powstawania skrzepu w trakcie pomiaru dając w efekcie fałszywie zawyżone stężenia dabigatranu. Do kalibracji używano przeznaczonych dla tej metody zestawu kalibratorów (~35, ~250 i ~500 ng/ml) Dabigatran Plasma Calibrator. Od kilku miesięcy stosuje się także zestaw kalibratorów (0, ~50 i ~100 ng/ml) Biophen Dabigatran Calibrator Low dla stężeń poniżej 100 ng/ml. Nieprecyzja między seriami przy stężeniu dabigatranu około 100 ng/ml wynosiła <11,0%.

Interferencja BDA w badaniach koagulologicznych

Należy pamiętać, że BDA mogą interferować w innych testach chronometrycznych lub chromogennych, w których używa się FIIa lub FXa. Obecność BDA w próbce może zaniżać wyniki oznaczeń czynników krzepnięcia (II, V, VII, VIII, IX, X, XI i XII) metodami opartymi o PT i APTT, dawać zawyżone współczynniki w testach oporności na aktywowane białko C i fałszywie dodatnie wyniki oznaczeń antykoagulantu tocznia w metodach bazujących na APTT i teście z rozcieńczonym jadem żmii Russella (dRVVT; *dilute Russell viper venom time*) [44, 61, 62]. Dabigatran obecny w próbce może powodować fałszywie wysokie wyniki antytrombiny w metodzie opartej o hamowanie FIIa, a rywaroksaban, apiksaban i edoksaban w metodzie wykorzystującej hamowanie FXa [61, 62]. W obecności dabigatranu niektóre testy do oznaczania fibrynogeny metodą Claussa mogą zaniżać wyniki [44]. Rywaroksaban, apiksaban i edoksaban nie interferują w testach mierzących fibrynogen, czas trombinowy, czas reptylazowy, D-Dimer, czynnik von Willebranda (RCo; aktywność kofaktora rystocetyny i anty-

gen), FXIII, chromogennych testach do oznaczania plazminogenu i alfa-2-antyplazminy, a także w metodach ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [17, 62].

Uwagi praktyczne i własne wyniki

Do oznaczania stężeń BDA powinny być dostępne testy w trybie 24/7, umożliwiające wydanie wiarygodnego wyniku, przynajmniej w zakresie >30 ng/ml w czasie 1-2 godzin. Spełnienie tych warunków jest niezbędne, aby taki test był przydatny do oznaczenia stężenia leku u pacjenta leczonego BDA przed pilnym zabiegiem chirurgicznym w razie zagrożenia życia. Opieranie się na informacji, ile czasu upłynęło od ostatniej dawki oraz na określeniu stanu nerek wobec doniesień o słabej korelacji między klirensiem kreatyniny a stężeniem leków [63], może być niewystarczające. Z własnego doświadczenia wynika, że do 10% przypadków, gdzie spodziewać się można maksymalnego stężenia leku, jego poziom był niewykrywalny.

W omawianym okresie w naszym laboratorium wykonano 374 oznaczenia rywaroksabanu, w tym 58 (16%) oznaczeń było zleconych w trybie „cito” u pacjentów z Izby Przyjęć lub z oddziałów szpitalnych. W 229 (61%) przypadkach stężenie rywaroksabanu było <50 mg/ml. Maksymalne stężenie wynosiło 846 ng/ml z próbki pobranej od pacjenta (52 lata) na Izbie Przyjęć 7 godzin po ostatniej dawce leku. Odnotowano 5 (1%) przypadków powyżej „on-therapy range”. Nieprecyzja między seriami przy stężeniu rywaroksabanu w próbce około 100 ng/ml wynosiła <15%.

Od września 2016 do kwietnia 2017 roku wykonano 22 oznaczenia apiksabanu. Dla 8 próbek (dawki 2,5 lub 5,0 mg 2 razy dziennie) pobranych w czasie oczekiwanego maksymalnego poziomu we krwi mediana stężenia apiksabanu wynosiła 135 ng/ml. Najniższe i najwyższe stężenia dla tego czasu wynosiły odpowiednio 68 ng/ml (1,5 godziny po dawce 2,5 mg) i 477 ng/ml (2,5 godziny po dawce 5 mg). Z kolei dla 8 próbek pobranych w czasie 10-16 godzin po ostatniej dawce (2,5 mg lub 5,0 mg) stężenia minimalne, mediana i maksymalne były odpowiednio 29, 55 i 133 ng/ml. Stężenie dabigatranu mierzono 136 razy, w tym 59 (43%) razy u pacjentów hospitalizowanych. Mediana (minimum – maksimum) czasu oczekiwania na wynik obejmującego zlecenie badania, pobranie materiału transport próbki do laboratorium, przygotowanie odczynników, oznaczenie próbek kontrolnych i ewentualnie wykonanie kalibracji, analizę próbki badanej i autoryzację wyniku wynosiła 101 minut (53 – 143 minuty) wyliczona dla 9 próbek pobranych na Izbie Przyjęć. W jednym przypadku był wynik nieoznaczalny, najpewniej z powodu wysokiego poziomu heparyny w próbce, na co wskazywały nieoznaczalne TT, PT i APTT, przy prawidłowym czasie reptylazowym. W 61 (45%) próbkach stężenie dabigatranu wynosiło <35 ng/ml. Maksymalne stężenie wynosiło 379 ng/ml uzyskane z próbki pobranej 5 godzin po ostatniej dawce leku od pacjenta z ZZG (48 lat, dawka 150 mg 2 razy dziennie). Nie odnotowano wyników powyżej „on-therapy range”.

Mimo, że nie ma wyznaczonych szkodliwych lub terapeutycznych zakresów stężeń dla BDA, to są proponowane konkretne wartości jako poziomy decyzyjne. W przypadku rywaroksabanu uzyskanie stężenia przekraczającego 90-ty percentyl zakresu stężeń przed ko-

lejną dawką może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem krwawienia [37]. Zmierzenie aktualnego stężenia BDA we krwi pacjenta może wpłynąć na odłożenie wykonania zabiegu lub uzasadnione zastosowanie odpowiedniego antidotum, jeśli jest dostępne. Gdy stężenie nie przekracza 30 ng/ml, to proponowane schematy postępowania dopuszczają przeprowadzenie pilnego zabiegu chirurgicznego. W takim przypadku podanie antidotum nie wydaje się zasadne z uwagi na możliwe skutki uboczne oraz znaczny jego koszt [20]. Ponieważ efektu antykoagulacyjnego BDA się nie monitoruje, to oznaczenia są wykonywane pojedynczo. Dodatkowo dla oddziało chirurgicznych powinny być dostępne całą dobę i możliwe do wykonania w czasie nie dłuższym niż 1-2 godziny. To rodzi szereg problemów logistycznych począwszy od przeszkolenia odpowiedniej liczby osób z personelu laboratorium, po zabezpieczenie odczynników, w tym kalibratorów i materiałów kontrolnych, z uwzględnieniem ich stabilności. Ilość czynników wpływających na wynik wykonywany w takich warunkach jest znacznie większa, niż w przypadku wykonywania badań w dużych seriach, w ustalonych terminach, na jednej serii odczynników. Testy oparte na rozcieńczonym czasie trombinowym i chromogennym pomiarze aktywności anty-FXa są w stanie wiarygodnie oznaczyć stężenia BDA w zakresie 30-50 ng/ml. Jednak trzeba brać pod uwagę, że w warunkach rutynowej pracy, gdy test powinien być dostępny w każdej chwili do pilnego oznaczenia nawet jednej próbki, precyzja wyników będzie gorsza od tej podawanej w materiałach firmowych dołączonych do odczynników lub nawet podawanych w publikacjach, gdzie wpływ różnych czynników zakłócających był znacznie ograniczony. Aby polepszyć jakość oznaczeń w zakresie stężeń poniżej 100 ng/ml producenci dostarczają specjalnych zestawów kalibratorów. Zastosowanie takich kalibratorów poprawia korelację, liniową regresję i ocenę zgodności (inter-rater reliability) z pomiarami wykonanymi metodą LC-MS/MS [42]. Niestety, wiąże się to z wydłużeniem czasu wykonania oznaczenia i wzrostem kosztów.

W razie braku dostępu do swoistych testów do oznaczania stężenia BDA, nadal zaleca się używać testy globalne PT i APTT do względnej oceny stopnia antykoagulacji wywołanej obecnością tych leków [64]. W praktyce jakkolwiek wynik (prawidłowy lub przedłużony) PT lub APTT jest trudny do interpretacji. Należy pamiętać, że wyniki tych testów mogą być przedłużone nie tylko pod wpływem działania BDA. Na podstawie jednego przedłużonego wyniku PT lub APTT trudno wnosić o obecności BDA w próbce, nawet jeżeli pacjent potwierdza stosowanie takiej antykoagulacji. Z drugiej strony, prawidłowy PT lub APTT nie daje gwarancji nieobecności, ani nawet nie wyklucza istotnych klinicznie stężeń BDA [21]. Trzeba brać także pod uwagę, że różne odczynniki do PT i APTT mają inną czułość w stosunku do różnych BDA. Przy tym samym stężeniu leku PT wykonany na jednym odczynniku może być przedłużony, podczas gdy wykonany na innym może być prawidłowy. Może to prowadzić do błędnych interpretacji wyników rutynowych testów krzepnięcia [5].

Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono aktualną wiedzę o metodach oznaczania BDA i krótko omówiono własne doświadczenia uzyskane w czasie rutynowej pracy laboratorium szpitalnego.

BDA stają się powszechnie stosowane u polskich pacjentów. To wymaga poznania specyfiki działania tych leków i ich wpływu na rutynowe i specjalistyczne badania układu hemostazy [65]. Mimo podkreślanej zalety tych leków jaką jest brak potrzeby rutynowego monitorowania, w Polsce, jak w innych krajach, muszą być ośrodki dysponujące metodami pozwalającymi na szybki i wiarygodny pomiar stężenia BDA w nagłych przypadkach. Przy wykonywaniu badań układu hemostazy u pacjentów zażywających BDA szczególnie ważna jest współpraca między lekarzem i diagnostą laboratoryjnym. Interpretacja wyniku stężenia BDA musi uwzględniać czas pobrania próbki oraz właściwości i ograniczenia testu/metody zastosowanej do wykonania oznaczenia.

Piśmiennictwo

- Lee LH. DOACs – advances and limitations in real world. *Thromb J* 2016; 14 (Suppl 1): 17. DOI: 10.1186/s12959-016-0111-3.
- Cohen AT, Hamilton M, Mitchell SA, et al. Comparison of the novel oral anticoagulants apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in the initial and long-term treatment and prevention of venous thromboembolism: systematic review and network meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10. DOI: 10.1371/journal.pone.0144856.
- Venker BT, Ganti BR, Lin H, et al. Safety and efficacy of new anticoagulants for the prevention of venous thromboembolism after hip and knee arthroplasty: a meta-analysis. *J Arthroplasty* 2017; 32: 645-652.
- Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2014; 383: 955-962.
- Czupryńska J, Patel JP, Arya R. Current challenges and future prospects in oral anticoagulant therapy. *Br J Haematol* 2017. DOI: 10.1111/bjh.14714.
- Hicks T, Stewart F, Eisinga A. NOACs versus warfarin for stroke prevention in patients with AF: a systematic review and meta-analysis. *Open Heart* 2016; 3. DOI: 10.1136/openhrt-2015-000279.
- Almutairi AR, Zhou L, Gellad WF, et al. Effectiveness and safety of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants for atrial fibrillation and venous thromboembolism: a systematic review and meta-analyses. *Clin Ther* 2017. DOI: 10.1016/j.clinthera.2017.05.358.
- Łukasik M, Zawilska K, Undas A. Intracranial bleedings in patients on long-term anticoagulant treatment: Benefits from oral thrombin and factor Xa inhibitors in clinical practice. *Neurol Neurochir Pol* 2015; 49: 171-179.
- Bertoletti L, Ollier E, Duvillard C, et al. Direct oral anticoagulants: Current indications and unmet needs in the treatment of venous thromboembolism. *Pharmacol Res* 2017; 118: 33-42.
- Di Minno A, Frigerio B, Spadarella G, et al. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Rev* 2017; 31: 193-203.
- Shearer MJ, Newman P. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *J Lipid Res* 2014; 55: 345-362.
- Mital A, Łętowska M, Chojnowski K, et al. Polskie zalecenia dotyczące leczenia antagonistami witaminy K. *J Transf Med* 2013; 6: 41-47.
- Douxflis J, Tamigniau A, Chatelain B, et al. Measurement of non-VKA oral anticoagulants versus classic ones: the appropriate use of hemostasis assays. *Thromb J* 2014; 12: 24. DOI: 10.1186/1477-9560-12-24.
- Salmonson T, Dogné JM, Janssen H, et al. Non-vitamin-K oral anticoagulants and laboratory testing: now and in the future: Views from a workshop at the European Medicines Agency (EMA). *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 2017; 3: 42-47.
- Shameem R, Ansell J. Disadvantages of VKA and requirements for novel anticoagulants. *Best Pract Res Clin Haematol* 2013; 26: 103-114.
- Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, et al. New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Ther Clin Risk Manag* 2015; 11: 967-977.
- Amiral J, Dunois C, Amiral C, et al. Anti-Xa bioassays for the laboratory measurement of direct Factor Xa inhibitors in plasma, in selected patients. *Transfus Apher Sci* 2016; 55: 249-261.

18. Harenberg J, Du S, Wehling M, et al. Measurement of dabigatran, rivaroxaban and apixaban in samples of plasma, serum and urine, under real life conditions. An international study. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 275-283.
19. Cuker A. Laboratory measurement of the non-vitamin K antagonist oral anticoagulants: selecting the optimal assay based on drug, assay availability, and clinical indication. *J Thromb Thrombolysis* 2016; 41: 241-247.
20. Weitz JI, Eikelboom JW. Urgent Need to Measure Effects of Direct Oral Anticoagulants. *Circulation* 2016; 134: 186-188.
21. Samuelson BT, Cuker A, Siegal DM, et al. Laboratory assessment of the anticoagulant activity of direct oral anticoagulants: a systematic review. *Chest* 2017; 151: 127-138.
22. Connolly SJ, Milling TJ Jr, Eikelboom JW, et al. Andexanet alfa for acute major bleeding associated with factor Xa inhibitors. *N Engl J Med* 2016; 375: 1131-1141.
23. Huisman MV, Fanikos J. Idarucizumab and factor Xa reversal agents: role in hospital guidelines and protocols. *Am J Emerg Med* 2016; 34: 46-51.
24. Pernod G, Albaladejo P, Godier A, et al. Management of major bleeding complications and emergency surgery in patients on long-term treatment with direct oral anticoagulants, thrombin or factor-Xa inhibitors: proposals of the Working Group on Perioperative Haemostasis (GIHP) – March 2013. *Arch Cardiovasc Dis* 2013; 106: 382-393.
25. Godier A, Martin AC, Leblanc I, et al. Peri-procedural management of dabigatran and rivaroxaban: Duration of anticoagulant discontinuation and drug concentrations. *Thromb Res* 2015; 136: 763-768.
26. Levy JH, Ageno W, Chan NC, et al. When and how to use antidotes for the reversal of direct oral anticoagulants: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 623-627.
27. Wright C, Brown R, Cuker A. Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants: Indications and impact on management in clinical practice. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 31-36.
28. Martin K, Moll S. Direct oral anticoagulant drug level testing in clinical practice: A single institution experience. *Thromb Res* 2016; 143: 40-44.
29. Pradaxa: Summary of Product Characteristics. Boehringer Ingelheim International GmbH. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf. Retrieved 2017-07-04.
30. Xarelto: Summary of Product Characteristics. Bayer Pharma AG. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf. Retrieved 2017-07-04.
31. Eliquis: Summary of Product Characteristics. Bristol-Myers Squibb / Pfizer EEIG. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002148/WC500107728.pdf. Retrieved 2017-07-04
32. Lixiana: Summary of Product Characteristics. Daiichi Sankyo UK. <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/30506#PRODUCTINFO>. Retrieved 2017-07-04
33. Cuker A, Siegal D. Monitoring and reversal of direct oral anticoagulants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015: 117-124.
34. Samuelson BT, Cuker A. Measurement and reversal of the direct oral anticoagulants. *Blood Rev* 2017; 31: 77-84.
35. Douxfils J, Mani H, Minet V, et al. Non-VKA oral anticoagulants: accurate measurement of plasma drug concentrations. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 345138. DOI: 10.1155/2015/345138.
36. Dale BJ, Chan NC, Eikelboom JW. Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants. *Br J Haematol* 2016; 172: 315-336.
37. Douxfils J, Tamigniau A, Chatelain B, et al. Comparison of calibrated chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban. *Thromb Haemost* 2013; 110: 723-731.
38. Schmitz EM, Boonen K, van den Heuvel DJ, et al. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1636-1646.
39. Delavenne X, Mismetti P, Basset T. Rapid determination of apixaban concentration in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 78-79: 150-153.
40. Emmerechts J, Ameye S, Engelrest D, et al. A single analysis for simultaneous measurement of all 4 DOACs. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2017; 1. S1: 523-524. DOI: 10.1002/rth2.12012.
41. Mueller J, Hesse A, Kieper-Rupp I, et al. A new chromogenic DTI assay for the quantitative determination of dabigatran in human plasma. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2017; 1. S1: 498. DOI: 10.1002/rth2.12012.
42. Königsbrügge O, Quehenberger P, Belik S, et al. Anti-coagulation assessment with prothrombin time and anti-Xa assays in real-world patients on treatment with rivaroxaban. *Ann Hematol* 2015; 94: 1463-1471.
43. Hemoclot Thrombin Inhibitors. HyphenBioMed. Package insert. Last revision 17/03/2015.
44. Kitchen S, Gray E, Mackie I, et al. Measurement of non-coumarin anticoagulants and their effects on tests of Haemostasis: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 166: 830-841.
45. Gosselin RC, Adcock D, Hawes EM, et al. Evaluating the use of commercial drug-specific calibrators for determining PT and APTT reagent sensitivity to dabigatran and rivaroxaban. *Thromb Haemost* 2015; 113: 77-84.
46. Testa S, Legnani C, Tripodi A, et al. Poor comparability of coagulation screening test with specific measurement in patients receiving direct oral anticoagulants: results from a multicenter/multiplatform study. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 2194-2201.
47. Ebner M, Birschmann I, Peter A, et al. Point-of-care testing for emergency assessment of coagulation in patients treated with direct oral anticoagulants. *Crit Care* 2017; 21: 32. DOI: 10.1186/s13054-017-1619-z.
48. Vedovati MC, Mosconi MG, Isidori F, et al. Thromboelastometry to detect anticoagulant effect of apixaban in patients with non valvular atrial fibrillation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2017; 1. S1: 500-501. DOI: 10.1002/rth2.12012.
49. Mani H, Herth N, Kasper A, Wendt T, Schuettfort G, Weil Y, Pfeilschifter W, Linemann B, Herrmann E, Lindhoff-Last E. Point-of-care coagulation testing for assessment of the pharmacodynamic anticoagulant effect of direct oral anticoagulant. *Ther Drug Monit* 2014; 36: 624-631.
50. Ebner M, Peter A, Spencer C, et al. Point-of-care testing of coagulation in patients treated with non-vitamin K antagonist oral anticoagulants. *Stroke* 2015; 46: 2741-2747.
51. Samama MM, Martinoli JL, LeFlem L, et al. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban—an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost* 2010; 103: 815-825.
52. Vandendriessche S, De Somer F, Laverge H, et al. Comparison of activated clotting time measured by I-STAT, Sonoclot and ACTPlus and correlation with anti-Xa during cardiopulmonary bypass procedures. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2017; 1. S1: 514-515. DOI: 10.1002/rth2.12012.
53. Zalewski J, Rychlak R, Góralczyk T, et al. Rivaroxaban concentration in patients with deep vein thrombosis who reported thrombus progression or minor hemorrhagic complications: first Polish experience. *Pol Arch Med Wewn* 2014; 124: 553-555.
54. Czubek U, Góralczyk T, Zalewski J, et al. Monitoring of anticoagulant effects of dabigatran in everyday practice: first experience in 32 Polish patients. *Pol Arch Med Wewn* 2014; 124: 487-489.
55. Góralczyk T, Wojtowicz KB, Undas A. Activated protein C resistance in patients following venous thromboembolism receiving rivaroxaban versus vitamin K antagonists: assessment using Russell viper venom time-based assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2017; 28: 309-315.
56. Góralczyk T, Iwaniec T, Wypasek E, et al. False-positive lupus anticoagulant in patients receiving rivaroxaban: 24h since the last dose are needed to exclude antiphospholipid syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015; 26: 473-475.
57. Góralczyk T, Undas A. Routine coagulation tests and thrombophilia screening in real-life patients following venous thromboembolism treated with rivaroxaban. *Przeg Lek* 2017; 5: 194-199.
58. Undas A, Góralczyk T. Direct Oral Anticoagulants in Patients with Thrombophilia: Challenges in Diagnostic Evaluation and Treatment. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25: 1321-1330.
59. Undas A, Góralczyk T. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with severe inherited thrombophilia: a series of 33 patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2017; 28: 438-442.
60. Malec K, Góralczyk T, Undas A. The use of direct oral anticoagulants in 56 patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2017; 152: 93-97.
61. Mani H. Interpretation of coagulation test results under direct oral anticoagulants. *Int J Lab Hematol* 2014; 36: 261-268.
62. Gosselin R, Grant RP, Adcock DM. Comparison of the effect of the anti-Xa direct oral anticoagulants apixaban, edoxaban, and rivaroxaban on coagulation assays. *Int J Lab Hematol* 2016; 38: 505-513.

63. Testa S, Tripodi A, Legnani C, et al. Plasma levels of direct oral anticoagulants in real life patients with atrial fibrillation: Results observed in four anticoagulation clinics. *Thromb Res* 2016; 137: 178-183.
64. Lim MS, Chapman K, Swanepoel P, et al. Sensitivity of routine coagulation assays to direct oral anticoagulants: patient samples versus commercial drug-specific calibrators. *Pathology* 2016; 48: 712-719.
65. Raszeja-Specht A, Michno A. Doustne antykoagulanty o działaniu bezpośrednim – nowe wyzwanie dla diagnostyki laboratoryjnej. *Diagn Lab* 2015; 51: 221-228.

Autor do korespondencji:

mgr Tadeusz Góralczyk
Laboratorium Analityczne
Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II
31-202 Kraków, ul. Prądnicka 80
tel. +48 12 6143156
email: t.goralczyk@szpitaljp2.krakow.pl

Otrzymano: 25.07.2017

Akceptacja do druku: 22.09.2017

Konflikt interesów: nie zgłoszono