



Pacific Hemostasis®

Thromboplastin-D

I. Intended Use

Pacific Hemostasis Thromboplastin-D is intended for use in performing the one-stage prothrombin time (PT) test and PT-based factor assays.

II. Summary and Principles

The PT is used as a screening tool and as a quantitative test for coagulation factors in the extrinsic and common pathways. This test will be prolonged in patients with acquired or congenital disorders that reduce the activity of factors I (fibrinogen), II (Prothrombin), V, VII, and X. The PT is also widely used to monitor oral anticoagulant therapy.^{1,2} Oral anticoagulants reduce the activity of vitamin-K dependent clotting factors (II, VII, IX, X, Protein C, and Protein S), and the PT is prolonged as a result.

The one-stage PT measures the clotting time of plasma after adding a source of tissue factor (thromboplastin) and calcium. The recalcification of plasma in the presence of tissue factor generates activated Factor Xa (F.Xa). F.Xa in turn activates Prothrombin to thrombin, which converts fibrinogen to an insoluble fibrin clot.

III. Reagent

For *in vitro* diagnostic use.

Composition: <0.9% rabbit brain tissue, 0.08% sodium azide, 2% buffers, salts and stabilizers

Store unopened vials at 2-8°C. Reconstitute with preservative-free distilled/deionized water according to the Thromboplastin-D vial label, swirl gently and let the vial stand undisturbed for 15 minutes at room temperature. Do not invert the vial or mix vigorously. Reconstitution fluid is available if the quality of water is questionable. After reconstitution, the reagent when stored stoppered is stable for 7 days at 2-8°C, 8 hours at 37°C. Store at 2-8°C when not in use. **Do not freeze.**

Mix gently before each use. Provide some mechanism, such as a magnetic stirrer, to maintain adequate suspension during use. Lack of vacuum in vials, erratic results, quality control values outside established ranges, or product color variations could indicate deterioration. However, poor performance could also be due to other factors within the test system.

Warning: Thromboplastin-D contains sodium azide. Sodium azide under acidic conditions yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Azide compounds should be diluted with running water before being discarded. Upon disposal, azide compounds should be flushed with large volumes of water. These precautions are recommended to avoid deposits in metal pipes in which explosive conditions may develop.

CAUTION: This product contains animal source material. Handle and dispose of this product as if it were potentially infectious.

IV. Specimen Collection

3.2% (0.109M) trisodium citrate anticoagulant is recommended for coagulation assays. Avoid hemolysis and contamination by tissue fluids. Samples that have less than 90% of the expected full volume should be rejected. Centrifuge blood for 15 minutes at 1500 x g. Test within 2 hours if samples are held at 22-24°C. If testing is not completed within 24 hours, plasma should be frozen at -20°C for up to two weeks or -70°C for up to 6 months. For more details on specimen collection and storage, see NCCLS Document H21-A4.³

- Do not delay mixing the blood with anticoagulant.
- Avoid foaming the specimen.
- Use only plastic or siliconized glass containers.
- Turbid, icteric, lipemic, or hemolyzed specimens may generate erroneous results.
- Freezing and thawing plasma that contains residual cells will generate damaged cell membranes that can affect results.
- Acute inflammatory reactions can shorten PT results because of elevated fibrinogen.
- Plasma samples with hematoцитis outside the range of 20-55% may be improperly anticoagulated and should be adjusted appropriately.

V. Test Procedure

Materials Provided: Thromboplastin-D Reagent, 10 x 4 mL, 10 x 10 mL, or 10 x 2 mL

Materials Required, But Not Provided:

Distilled or Deionized water, or Pacific Hemostasis Reconstitution Fluid

Stopwatch or timer

Precision pipette: 0.1 and 0.2 mL

Normal and abnormal controls such as Pacific Hemostasis Coagulation Control Plasmas, Level 1, 2, and 3

Thromboplastin-D is suitable for use with manual, mechanical, photo-optical, nephelometric, or other means of clot detection. Follow manufacturer's recommendations for proper use of instrumentation. For manual assays:

- A. Prewarm Thromboplastin-D to 37°C.
- B. Add 0.1 mL test plasma to cuvette and prewarm to 37°C.
- C. Forcibly add 0.2 mL warmed Thromboplastin-D to the test plasma and time clot formation.

VI. Quality Control

Normal and abnormal plasmas such as Pacific Hemostasis Coagulation Control Level 1, 2, and 3 should be tested in conjunction with patient plasmas. Level 1 is a lyophilized normal plasma. Levels 2 and 3 are adjusted to mimic moderately and severely deficient plasmas, respectively. Normal and abnormal controls should be run at the initiation of testing each day and at least once each shift, or with each group of assays. Controls should also be tested with each reagent change or major instrument adjustment. Each laboratory should establish a control group range to represent the allowable variation in day to day performance for each control.

VII. Results

Report clotting times for each plasma to the nearest 0.1 second. A Normal Reference Range can also be reported for comparison. Do not report patient values relative to commercial control plasma clotting times. Controls are intended only for quality assurance of the test system.

Determination of INR

An undesirable consequence of oral anticoagulant therapy may be a tendency to bleed unnecessarily. In order to maximize the desired therapeutic effects and minimize bleeding, the World Health Organization (WHO) has recommended a procedure to standardize testing and treatment. This procedure is based on the International Normalized Ratio (INR).⁴

The INR is calculated using the ratio of the patient PT to the mean of a normal reference range (meanNRR) according to the following mathematical relationship:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{Patient PT}}{\text{meanNRR}} \right)^{\text{ISI}}$$

For example, with an ISI of 1.95 and a mean normal of 11.9 seconds, the INR for a PT of 20.0 seconds is calculated as follows:

$$\text{INR} = \left(\frac{20.0}{11.9} \right)^{1.95} = (1.68)^{1.95} = 2.7$$

The International Sensitivity Index (ISI) is a measure of a thromboplastin/instrument sensitivity to coagulation factors. ISI values are assigned by comparison to a primary reference material. High sensitivity reagents have low ISI values. According to WHO recommendations, INR values above 5.5 place the patient at unnecessary risk for bleeding complications. It is generally advised that patients on stabilized oral anticoagulant therapy should be maintained at an INR of 2.0 – 3.5, depending on the clinical indication.⁵ The lot specific ISI value for Thromboplastin-D can be found on the kit box label. (For additional instrument ISI values, call Fisher Diagnostics.)

VIII. Limitations

The biochemistry of coagulation involves a series of reactions that are influenced by many pre-test conditions. These variables must be controlled to obtain reproducible results.³

Technique

- pH will increase if plasma is open to air. Store samples stoppered in plastic or siliconized glass.
- Plasma held at 4-8°C may undergo cold activation resulting in significant shortening of the PT.*
- Thromboplastin-D was designed to work at 37°C ± 0.5°C. Frequently check the temperature of all heating



Pacific Hemostasis®

Thromboplastin-D

I. Verwendungszweck

Pacific Hemostasis Thromboplastin-D ist zur Verwendung bei der Durchführung des Einstufen-Prothrombinzeit(PT)-Tests und von Faktor-Assays auf PT-Basis vorgesehen.

II. Zusammenfassung und Testprinzip

Die PT wird als ein Suchtest und als ein quantitativer Test auf Gerinnungsfaktoren im extrinsischen Weg und auf der gemeinsamen Endstrecke verwendet. Dieser Test fällt bei Patienten mit erworbene oder ererbten Krankheiten, die die Aktivität der Faktoren I (Fibrinogen), II (Prothrombin), V, VII und X reduzieren, länger aus. Die Prothrombinzeit wird auch weit hin zur Überwachung der oralen Antikoagulantientherapie verwendet.¹² Orale Antikoagulanzien reduzieren die Aktivität der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X, Protein C und Protein S), und die PT ist infolgedessen verlängert.

Der Einstufen-PT-Test misst die Gerinnungszeit von Plasma nach Zugabe einer Quelle von Gewebefaktor (Thromboplastin) und Calcium. Die Kalzifizierung von Plasma in Anwesenheit von Gewebefaktor erzeugt aktivierte Faktor Xa (F.Xa). F.Xa wiederum aktiviert Prothrombin zu Thrombin, das Fibrinogen in ein unlösliches Fibringerinnel umwandelt.

III. Reagens

Für die *In-vitro*-Diagnostik.

Zusammensetzung: <0,9% Hirngewebe (Kaninchen), 0,08% Natriumazid, 2% Puffer, Salze und Stabilisatoren.

Ungeöffnete Fläschchen bei 2-8°C aufbewahren. Mit konservierungsmittelfreiem destilliertem/deionisiertem Wasser gemäß Etikett des Thromboplastin-D-Fläschchens rekonstituieren, behutsam schwenken und 15 Minuten ungestört bei Raumtemperatur stehen lassen. Das Fläschchen nicht umkehren oder kräftig schütteln. Eine Rekonstitutionsflüssigkeit steht zur Verfügung, falls die Wassergüte fragwürdig sein sollte. Nach der Rekonstitution ist das verschlossene Reagens bei 2-8°C 7 Tage stabil, bei 37°C 8 Stunden. Während des Nichtgebrauchs bei 2-8°C lagern. Nicht einfrieren.*

Vor jedem Gebrauch behutsam mischen. Mithilfe eines Mechanismus wie z.B. eines Magnetrührers eine ausreichende Suspension während der Verwendung aufrechterhalten. Fehlender Unterdruck in den Fläschchen, regellose Ergebnisse, Qualitätskontrollwerte außerhalb der festgelegten Bereiche und Farbabweichungen des Produkts können Anzeichen einer Qualitätsminderung sein. Eine mangelhafte Leistung kann allerdings auch in anderen Faktoren innerhalb des Testsystems begründet sein.

Warnung: Thromboplastin-D enthält Natriumazid. Unter sauren Bedingungen entsteht aus Natriumazid Stickstoffwasserstoffsaure, eine extrem toxische Verbindung. Azidverbindungen sind vor der Entsorgung mit fließendem Wasser zu verdünnen. Nach der Entsorgung von Azidverbindungen mit reichlich Wasser nachspülen. Diese Vorsichtsmaßnahmen werden empfohlen, um Ablagerungen in Metallröhren zu vermeiden, in denen explosionsgefährliche Bedingungen entstehen können.

VORSICHT: Dieses Produkt enthält Materialien tierischen Ursprungs. Dieses Produkt muss wie potentiell infektiöses Material gehandhabt und entsorgt werden.

IV. Präzision

Für Gerinnungsassays wird als Antikoagulans 3,2%iges Trinatriumcitrat (0,109 M) empfohlen. Hämolys und Kontamination durch Gewebeflüssigkeiten vermeiden. Proben mit weniger als 90% des erwarteten Füllvolumens sollten verworfen werden. Blut 15 Minuten bei 1500 x g zentrifugieren. Innerhalb von 2 Stunden testen, wenn die Proben auf 22-24 °C gehalten werden. Wenn die Tests nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden, ist das Plasma bis zu zwei Wochen bei -20°C oder bis zu 6 Monate bei -70°C einzufrieren. Weitere Informationen zur Entnahme und Lagerung von Proben siehe NCCLS-Dokument H21-A4.³

- Das Mischen des Bluts mit dem Antikoagulans sollte unverzüglich erfolgen.
- Schäumen der Probe vermeiden.
- Nur Behälter aus Kunststoff oder siliconisiertem Glas verwenden.
- Geträute, ikerische, lipämische oder hämolierte Proben können zu falschen Ergebnissen führen.
- Das Einführen und Wiederauftauen von Restzellen enthaltendem Plasma verursacht eine Schädigung der Zellmembranen, die die Ergebnisse beeinträchtigen kann.
- Akute Entzündungsreaktionen können aufgrund des erhöhten Fibrinogenwerts die PT-Ergebnisse verkürzen.
- Plasmaproben mit einem Hämatokritwert außerhalb des Bereichs von 20-55 % sind möglicherweise nicht richtig antikoaguliert und sollten entsprechend korrigiert werden.

V. Testverfahren

Im Lieferumfang enthaltene Materialien: Thromboplastin-D-Reagens, 10 x 4 ml, 10 x 10 ml oder 10 x 2 ml

Erforderliche, jedoch nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien:

Destilliertes oder deionisiertes Wasser oder Pacific Hemostasis Rekonstitutionsflüssigkeit
Stoppuhr oder Zeitmesser
Präzisionspipette: 0,1 und 0,2 ml

Normale und abnormale Kontrollen wie z.B. die Pacific Hemostasis Gerinnungskontrollplasmen, Stufe 1, 2 und 3 Thromboplastin-D ist zur Verwendung mit manuellen, mechanischen, lichtoptischen, nephelometrischen oder anderen Mitteln zur Gerinnungserkennung geeignet. Die Empfehlungen des Geräteherstellers zur sachgemäßen Verwendung sind zu beachten. Manuelle Assays:

- A. Thromboplastin-D auf 37°C vorwärmen.
- B. 0,1 ml Testplasma in die Kuvette geben und auf 37°C vorwärmen.
- C. 0,2 ml erwärmtes Thromboplastin-D forcieren dem Testplasma zugeben und die Zeit bis zur Gerinnungsbildung messen.

VI. Qualitätskontrolle

Normale und abnormale Plasmen wie z.B. die Pacific Hemostasis Gerinnungskontrolle (Stufe 1, 2 und 3) zusammen mit Patientenplasma zu testen. Stufe 1 ist ein lyophilisiertes Normalplasma. Stufe 2 und 3 sind so eingestellt, dass sie mäßig bzw. schwer mangelhafte Plasmen imitieren. Jeden Tag bei Beginn des Testens und mindestens einmal pro Schicht bzw. bei jeder Gruppe von Assays sind normale und abnormale Kontrollen zu analysieren. Kontrollen sollten außerdem bei jedem Reagenswechsel oder einer größeren Geräteteilung getestet werden. Jedes Labor sollte einen Kontrollgruppenbereich festlegen, der die zulässige Variationsbreite der täglichen Leistung für jede Kontrolle darstellt.

VII. Ergebnisse

Die Gerinnungszeiten für jedes Plasma sind auf die nächste Zehntelsekunde abgerundet zu berichten. Zum Vergleich kann auch ein normaler Referenzbereich berichtet werden. Keine Patientenwerte im Verhältnis zu den Gerinnungszeiten von kommerziell kontrolliertem Plasmas berichten. Die Kontrollen dienen nur zur Qualitätssicherung des Testsystems.

Bestimmung der INR

Eine mögliche unerwünschte Folge einer oralen Antikoagulantientherapie ist die Tendenz, unnötig zu bluten. Um den gewünschten therapeutischen Effekt zu maximieren und Blutungen zu minimieren, empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation (WHO) ein Verfahren zur Standardisierung der Testung und Behandlung. Dieses Verfahren beruht auf der „International Normalized Ratio“ (INR).^{6,7}

Die INR errechnet sich nach der folgenden mathematischen Formel aus dem Verhältnis der PT des Patienten zum Mittelwert eines normalen Referenzbereichs (MittelNRB):

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT Patient}}{\text{MittelNRB}} \right)^{\text{ISI}}$$

Die INR für eine PT von 20,0 Sekunden errechnet sich zum Beispiel bei einem ISI von 1,95 und einem mittleren Normalwert von 11,9 Sekunden wie folgt:

$$\text{INR} = \left(\frac{20,0}{11,9} \right)^{1,95} = (1,68)^{1,95} = 2,7$$

Der Internationale Sensitivitätsindex (ISI) ist ein Maß der Thromboplastin-/Geräte-Empfindlichkeit gegen Gerinnungsfaktoren. Die ISI-Werte werden im Vergleich zu einem primären Referenzmaterial zugewiesen. Hochempfindliche Reagenzien haben niedrige ISI-Werte. Laut WHO-Empfehlungen setzen INR-Werte von

mehr als 5,5 den Patienten einem unnötigen Risiko von Blutungskomplikationen aus. Allgemein wird geraten, bei Patienten unter stabilisierter oraler Antikoagulantientherapie je nach klinischer Indikation eine INR von 2,0–3,5 beizzuhalten.² Der chargenspezifische ISI-Wert für Thromboplastin-D ist auf dem Etikett des Kits angegeben. (ISI-Werte für weitere Geräte können telefonisch bei Fisher Diagnostics erfragt werden.)

VIII. Einschränkungen

Die Biochemie der Gerinnung umfasst eine Reihe von Reaktionen, die von vielen Bedingungen vor dem Test beeinflusst werden. Damit reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, müssen diese Variablen kontrolliert werden.³

Technik

- Der pH-Wert erhöht sich bei Kontakt des Plasmas mit der Luft. Die Proben in verschlossenen Behältern aus Kunststoff oder siliconisiertem Glas aufbewahren.
- Bei Lagerung des Plasmas bei 4-8°C kann es zu einer kalten Aktivierung kommen, was zu einer signifikanten Verkürzung der PT führt.⁴
- Thromboplastin-D wurde für die Verwendung bei 37°C ± 0,5 °C entwickelt. Die Temperatur aller Heizelemente ist regelmäßig zu kontrollieren.
- Alle Laboratikel müssen sauber und frei von Reinigungsmittelrückständen sein.
- Stets die Anweisungen des Herstellers für die ordnungsgemäße Wartung beachten.

Störsubstanzen

- Natriumoxalat, EDTA und Heparin sind keine geeigneten Antikoagulanzien.
- Die PT kann durch Substanzen wie orale Kontrazeptiva, Corticosteroid, EDTA, Asparaginase, Clofibrat, Erythromycin, Ethanol, Tetracyclin und Antikoagulanzien wie Heparin und Warfarin verlängert werden.⁵
- Die PT kann durch Substanzen wie Antihistamine, Butabarbital, Coffein, orale Kontrazeptiva, Phenobarbital und Vitamin K verkürzt werden.⁵

IX. Erwartete Werte

</div



Pacific Hemostasis®

Thromboplastine D

I. Utilisation prévue

Le réactif de thromboplastine D Pacific Hemostasis est utilisé pour réaliser le test du temps de prothrombine (TP) en une étape et les dosages de facteur basés sur le TP.

II. Résumé y principios

Le TP est utilisé comme outil de dépistage et comme test quantitatif des facteurs de coagulation dans les voies métaboliques intrinsèque et commune. Ce test donnera une valeur augmentée chez les patients atteints de troubles acquis ou congénitaux qui réduisent l'activité des facteurs I (fibrinogène), II (prothrombine), V, VII et X. Le TP est également largement utilisé pour surveiller le traitement anticoagulant oral.^{1,2} Les anticoagulants oraux réduisent l'activité des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K (II, VII, IX, X, protéine C et protéine S) et le TP est prolongé en conséquence.

Le TP en une étape mesure le temps de coagulation du plasma après l'ajout d'une source de facteur tissulaire (thromboplastine) et de calcium. La recalcification du plasma en présence du facteur tissulaire génère du facteur Xa actif (F.Xa). Le F.Xa active à son tour la prothrombine en thrombine, qui convertit le fibrinogène en un caillot de fibrine insoluble.

III. Réactif

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Composition : <0,9 % de tissu de cerveau de lapin, 0,08 % d'azoture de sodium, 2 % de tampons, sels et stabilisants.

Conserver les flacons non ouverts entre 2 °C et 8 °C. Reconstituer avec de l'eau distillée ou désionisée sans conservateur selon l'étiquette du flacon de thromboplastine D, agiter doucement et laisser le flacon reposer pendant 15 minutes à température ambiante. Ne pas retourner le flacon ni l'agiter vigoureusement. Du liquide de reconstitution est disponible si la qualité de l'eau est douteuse. Après la reconstitution, le réactif conservé bouché entre 2 °C et 8 °C est stable pendant 7 jours, pendant 8 heures à 37 °C. Conserver entre 2 °C et 8 °C quand le réactif n'est pas utilisé. **Ne pas congeler.**⁴

Mélaner doucement avant chaque utilisation. Prévoir un mécanisme tel qu'un agitateur magnétique pour maintenir une suspension adéquate pendant l'utilisation. L'absence de vide dans les flacons, des résultats irréguliers, des valeurs de contrôle qualité en dehors des plages établies ou des variations de couleur du produit peuvent indiquer une détérioration. Cependant, une performance insuffisante peut également être due à d'autres facteurs internes au système de test.

Attention : La thromboplastine D contient de l'azoture de sodium. Dans des conditions acides, l'azoture de sodium produit de l'acide hydrazoïque, un composé extrêmement toxique. Les composés d'azoture doivent être dilués avec de l'eau courante avant d'être éliminés. Lors de leur élimination, les composés d'azoture doivent être rincés avec de grands volumes d'eau. Ces précautions sont recommandées pour éviter les dépôts dans des canalisations métalliques dans lesquelles des conditions explosives pourraient apparaître.

MISE EN GARDE : ce produit contient du matériel d'origine animale. Ce produit doit être manipulé et éliminé comme du matériel potentiellement infectieux.

IV. Prélevement des échantillons

Le citrate de trisodium à 3,2 % (0,109 M) est l'anticoagulant recommandé pour les dosages de coagulation. Éviter l'hémolyse et la contamination par des liquides tissulaires. Les échantillons d'un volume inférieur à 90 % de la valeur de remplissage attendue doivent être refusés. Centrifuger le sang à 1 500 g pendant 15 minutes. Tester dans les 2 heures si les échantillons sont maintenus entre 22 °C et 24 °C. Si l'analyse n'est pas réalisée dans les 24 heures, le plasma doit être congelé à -20 °C pendant un maximum de deux semaines ou à -70 °C pendant un maximum de 6 mois. Pour plus de détails sur le prélevement et la conservation des échantillons, consulter le document NCCLS H21-A4⁵.

- Ne pas retarder le mélange du sang avec l'anticoagulant.
- Éviter de faire mousser l'échantillon.
- Utiliser uniquement des récipients en plastique ou en verre siliconé.
- Les échantillons troubles, icteriques, lipémiques ou hémolysés peuvent produire des résultats erronés.
- La congélation et la décongélation du plasma contenant des cellules résiduelles endommage les membranes cellulaires, ce qui peut affecter les résultats.
- Les réactions inflammatoires aiguës peuvent raccourcir les résultats de TP en raison de la concentration élevée en fibrinogène.
- Les échantillons de plasma avec un hématocrite en dehors de la plage de 20 à 55 % peuvent être anticoagulés de manière inadéquate et doivent être correctement ajustés.

V. Procédure de test

Matériel fourni : Réactif de thromboplastine D, 10 x 4 ml, 10 x 10 ml ou 10 x 2 ml

Matériel requis mais non fourni :

Eau distillée ou désionisée ou liquide de reconstitution Pacific Hemostasis

Chronomètre ou minuterie

Pipette de précision : 0,1 et 0,2 ml

Contrôles normaux et anormaux, comme les plasmas de contrôle de coagulation Pacific Hemostasis, niveaux 1, 2 et 3.

La thromboplastine D est adaptée à l'utilisation avec des moyens manuels, mécaniques, photo-optiques, néphélotométriques ou autres de détection de caillot. Suivre les recommandations du fabricant pour l'utilisation appropriée de l'instrumentation. Pour les dosages manuels :

- Préchauffer la thromboplastine D à 37 °C.
- Ajouter 0,1 ml de plasma à tester à la cuvette et le préchauffer à 37 °C.
- Ajouter énergiquement 0,2 ml de thromboplastine D chauffée au plasma à tester et chronométrer la durée de formation du caillot.

VI. Contrôle qualité

Tous les plasmas normaux et anormaux tels que le contrôle de coagulation Pacific Hemostasis, niveaux 1, 2 et 3 doivent être testés conjointement avec les plasmas de patient. Le niveau 1 est un plasma normal lyophilisé. Les niveaux 2 et 3 sont ajoutés pour imiter des plasmas présentant des carences respectivement modérées et sévères. Des contrôles normaux et anormaux doivent être exécutés au début de l'analyse chaque jour et au moins une fois par période de travail ou avec chaque groupe de dosages. Des contrôles doivent également être testés lors de chaque changement de réactif ou ajustement majeur de l'instrument. Chaque laboratoire doit définir une plage de groupe de contrôle pour représenter la variation admissible de la performance d'un jour à l'autre pour chaque contrôle.

VII. Résultats

Rendre les temps de coagulation pour chaque plasma au dixième de seconde le plus proche. Une plage normale de référence peut également être rendue à titre de comparaison. Ne pas rendre les valeurs de patient par rapport aux temps de coagulation d'un plasma de contrôle disponible dans le commerce. Les contrôles sont destinés uniquement à l'assurance qualité du système de test.

Détermination de l'INR

Une conséquence non souhaitable du traitement anticoagulant oral peut être une tendance à saigner inutilement. Afin de maximiser les effets thérapeutiques souhaités et de minimiser les saignements, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a recommandé une procédure pour normaliser l'analyse et le traitement. Cette procédure est basée sur le rapport normalisé international (International Normalized Ratio, INR).

L'INR est calculé par le rapport entre le TP du patient et la moyenne d'une plage de référence normale (moyenneNRR) selon la relation mathématique suivante :

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP de patient}}{\text{moyenneNRR}} \right)^{\text{ISI}}$$

par exemple, avec un ISI de 1,95 et une normale moyenne de 11,9 secondes, l'INR d'un TP de 20,0 secondes est calculé de la manière suivante :

$$\text{INR} = \left(\frac{20,0}{11,9} \right)^{1,95} = (1,68)^{1,95} = 2,7$$

L'index de sensibilité international (ISI) est une mesure de la sensibilité de la thromboplastine et de l'instrument aux facteurs de coagulation. Les valeurs d'ISI sont attribuées par comparaison avec un matériel de référence primaire. Les réactifs de sensibilité élevée ont des valeurs d'ISI faibles. Selon les recommandations de l'OMS, des valeurs d'INR supérieures à 5,5 font peser sur le patient un risque inutile de complications de saignement. Il est généralement conseillé que les patients sous traitement anticoagulant oral stabilisé soient maintenus à un INR de 2,0 à 3,5, selon l'indication clinique⁶. La valeur d'ISI spécifique du lot de thromboplastine D se trouve sur l'étiquette de la boîte du coffret. (Pour obtenir d'autres valeurs ISI spécifiques d'instrument, contacter Fisher Diagnostics.)



Pacific Hemostasis®

Tromboplastina D

I. Uso previsto

La tromboplastina D de Pacific Hemostasis está indicada para usarse en la realización de la prueba del tiempo de protrombina (TP) en una etapa y ensayos de factor basados en el TP.

II. Resumen y principios

El TP se usa como herramienta de detección y como una prueba cuantitativa de los factores de coagulación en las vías extrínsecas y comunes. Esta prueba se prolonga en pacientes con trastornos adquiridos o congénitos que reducen la actividad de los factores I (fibrinógeno), II (protrombina), V, VII y X. El TP también se usa ampliamente para supervisar el tratamiento anticoagulante oral.^{1,2} Los anticoagulantes orales reducen la actividad de los factores de coagulación dependientes de la vitamina K (II, VII, IX, X, proteína C y proteína S), y el TP es prolongado como resultado.

El TP en una etapa mide el tiempo de coagulación del plasma después de añadir una fuente de factor tisular (tromboplastina) y calcio. La recalcificación del plasma en presencia del factor tisular genera un Factor Xa (F.Xa) activado. El F.Xa a su vez activa la protrombina hasta convertirla en trombina, lo que convierte al fibrinógeno en un coágulo de fibrina insoluble.

III. Valeurs attendues

Dans des études multicentriques, la thromboplastine D a été utilisée pour doser une population de patients normaux et a obtenu les résultats suivants :⁸

Instrument	Moyenne TP (sec.)	Plage (± 2 ET)	N
Stago STA	11,3	10,4 à 12,2	129
Amelung KC 4A™	11,8	9,8 à 13,7	30
MLA™ Electra 1000C™	12,2	10,4 à 14,1	30

REMARQUE : La plage normale del STA es á estrecha con los échantillons frescos, celle de tous les autres instrumentos avec des échantillons congelés. Ces valeurs doivent être utilisées à titre de guide. Chaque laboratoire doit définir une plage de référence normale (Normal Reference Range, NRR) en utilisant l'instrumentation, les méthodes de prélevement de sang et les techniques d'analyse utilisées dans le laboratoire. La NRR doit être redéfinie ou au moins vérifiée lors du changement de numéro de lot du même réactif.⁸ Una nouvelle NRR doit être définie en cas de changement de réactif, d'instrumentation, de techniques de prélevement du sang ou d'anticoagulant.

El tiempo de coagulación de plasmas anormales depende de l'ISI del lote del reactivo en uso.

X. Caractéristiques des performances

Précision : la précision des résultats de temps de protrombine dépend de nombreux facteurs, tels que l'instrument, la technique et le réactif utilisé. La précision de la thromboplastine D a été évaluée en testant un plasma normal y un plasma anormal sur plusieurs instruments différents. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.⁸

Résumé des études de précision intra-série, % CV (N = 20)

Échantillon	BioMérieux MDA*	MLA Electra 1000C	Amelung KC 4A
Normal	0,8 %	0,6 %	2,0 %
Anormal	0,9 %	1,8 %	2,1 %

Sensibilité : la thromboplastine D détecte les carences dans la voie métabolique extrinsèque comme déterminé par le test du temps de protrombine. L'analyse de la sensibilité aux facteurs a été réalisée en diluant du plasma normal regroupé avec des plasmas présentant des carences en facteur de telle manière que la concentration totale d'un facteur se situe entre 0 et 100 %. L'analyse du TP de ces échantillons a été réalisée sur l'instrument MLA-1000C.⁸

Analysse de la sensibilité aux facteurs

% facteur	Temps de protrombine (sec.)			
	Facteur II	Facteur V	Facteur VII	Facteur X
100	10,9	11,3	11,2	11,4
50	10,5	12,6	12,2	13,0
40	10,5	12,1	12,8	13,3
30	10,9	13,8	13,5	14,5
20	11,4	15,2	14,3	15,9
10	13,4	17,6	16,0	19,6
0	34,0	55,9	25,9	108,8

Corrélation : les études de corrélation ont été réalisées par rapport à un réactif concurrent de thromboplastine de cerveau de lapin sur l'instrument MLA-1000C.¹¹

Corrélation TP	Corrélation INR
R = 0,97 y = 0,7406x + 2,945	R = 0,96 y = 0,9795x - 0,0029

IV. Recogida de muestras

Se recomienda un 3,2 % (0,109 M) de anticoagulante de citrato trisódico para los ensayos de coagulación. Evite la hemólisis y la contaminación por líquidos tisulares. Las muestras que tengan menos del 90 % del volumen de llenado esperado deben ser rechazadas. Centrifugue la sangre a 1500 x g durante 15 minutos. Analice en un plazo de 2 horas si las muestras se mantienen entre 22-24 °C. Si la prueba no se va a completar en un plazo de 24 horas, el plasma se debe congelar a -20 °C durante un máximo de dos semanas o a -70 °C durante un máximo de 6 meses. Para obtener más detalles sobre la recogida y el almacenamiento de las muestras, consulte el documento H21-A4 de NCCLS.³

- No retrase la mezcla de la sangre con el anticoagulante.
- Evite la formación de espuma en la muestra.
- Utilice solo recipientes de vidrio siliconizado o plástico.
- Las muestras turbias, ictericas, lipémicas o hémolíticas pueden generar resultados erróneos.
- La congelación y descongelación de plasma que contenga células residuales generará membranas celulares dañadas que pueden afectar a los resultados.
- Las reacciones inflamatorias agudas pueden acortar los resultados del TP debido a un elevado fibrinógeno. Las muestras de plasma con hematocrito fuera del intervalo del 20-55 % se podrían anticoagular indebidamente y deben ajustarse de forma adecuada.

V. Procedimiento de la prueba



Pacific Hemostasis®

Thromboplastin-D

I. Uso previsto

Thromboplastin-D di Pacific Hemostasis è destinata all'esecuzione del test monofase del tempo di protrombina (PT) e delle analisi del fattore basate su PT.

II. Riepilogo e principi del test

Il PT è utilizzato come strumento di screening nonché come test quantitativo per i fattori della coagulazione nei percorsi per via extrinsica e comune. Il test viene prolungato nei pazienti affetti da patologie congenite o acquisite che riducono l'attività dei fattori I (fibrinogeno), V, VII e X. Il PT viene, inoltre, largamente utilizzato per monitorare la terapia anticoagulante per via orale.¹² Gli anticoagulanti assunti per via orale riducono l'attività dei fattori della coagulazione dipendenti dalla vitamina K (II, VII, IX, X, proteina C e proteina S) con conseguente prolungamento del PT.

Il PT monofase misura il tempo di coagulazione del plasma dopo l'aggiunta del fattore tissutale (tromboplastina) e il calcio. La ricalcificazione del plasma in presenza del fattore tissutale attiva il fattore Xa (F.Xa). F.Xa attiva, a sua volta, la protrombina in trombina che converte il fibrinogeno in un coagulo di fibra insolubile.

III. Reagente

Per uso diagnostico *in vitro*.

Composizione: <0,9 % tessuto cerebrale di coniglio, 0,08 % azoturo di sodio, 2 % tamponi, sali e stabilizzatori.

Conservano le fiale chiuse a 2–8 °C. Ricostituire con acqua deionizzata/distillata priva di conservanti come riportato sull'etichetta della fiala di Thromboplastin-D, agitare delicatamente e lasciare riposare la fiala a temperatura ambiente per 15 minuti. Non capovolgere né agitare con forza la fiala. In caso di dubbi circa la qualità dell'acqua è disponibile un liquido per la ricostituzione. Una volta eseguita la ricostituzione, il reagente si mantiene stabile per 7 giorni se conservato in un contenitore tappato a 2–8 °C e per 8 ore se conservato a 37 °C. Quando non viene utilizzato, conservare a 2–8 °C. **Non congelare.**⁸

Miscelare delicatamente prima di ogni utilizzo. Ricorrere a un dispositivo meccanico, quale un agitatore magnetico, per mantenere un'adeguata sospensione durante l'uso. Assenza di vuoto nelle fiale, risultati errati, valori del controllo qualità esterni ai range stabiliti o variazioni del colore del prodotto potrebbero indicare una deteriorazione del medesimo. Prestazioni di basso livello potrebbero, tuttavia, essere dovute anche ad altri fattori relativi al sistema di analisi.

Avvertenza: Thromboplastin-D contiene azoturo di sodio. L'azoturo di sodio, in condizioni acide, produce acido idrazico, un composto estremamente tossico. Prima di smaltire i composti di azoturo diluirli con acqua corrente. Per smaltire i composti di azoturo sciacciarli con abbondante acqua. Si raccomandano queste precauzioni per evitare depositi della sostanza in questione nelle tubature metalliche in cui si potrebbero sviluppare atmosfere esplosive.

ATTENZIONE: questo prodotto contiene materiale di origine animale. Di conseguenza deve essere maneggiato e smaltito come prodotto potenzialmente infettivo.

IV. Raccolta dei campioni

Per i test di coagulazione si raccomanda l'uso, come anticoagulante, del citrato trisodico al 3,2% (0,109 M). Evitare l'emolisì e la contaminazione con fluidi tissutali. Gettare i campioni con meno del 90% del volume di riempimento previsto. Centrifugare il sangue per 15 minuti a 1500 giri. Eseguire il test entro 2 ore se i campioni sono conservati a 22–24 °C. Se il test non viene completato entro 24 ore, il plasma deve essere congelato a -20 °C fino a due settimane o a -70 °C fino a 6 mesi. Per maggiori dettagli sulla raccolta e la conservazione dei campioni, consultare il documento NCCLS H21-A4.¹³

- Non ritardare la miscelazione del sangue con l'anticoagulante.
- Evitare la formazione di schiuma nel campione.
- Utilizzare solo contenitori in plastica o in vetro siliconato.
- I campioni torbidi, itterici, lipemici o emolitici possono generare risultati errati.
- Il congelamento e lo scoglemento di plasma contenente cellule residue determina il danneggiamento delle membrane cellulari con la possibile compromissione dei risultati.
- Le reazioni infiammatorie acute possono accorciare i risultati del PT a causa del livello elevato di fibrinogeno.
- I campioni di plasma con ematocriti oltre il range di 20-55% possono risultare non correttamente anticoagulati e devono essere corretti di conseguenza.

V. Procedura analitica

Materiali forniti: Reagente Thromboplastin-D, 10 x 4 mL, 10 x 10 mL o 10 x 2 mL

Materiali necessari non forniti in dotazione

Acqua distillata o deionizzata oppure liquido di ricostituzione Pacific Hemostasis

Cronometro o timer

Pipetta di precisione: 0,1 e 0,2 mL

Controlli normali e anomali come il plasma per il controllo della coagulazione Pacific Hemostasis, livelli 1, 2 e 3.

Thromboplastin-D è indicato per l'uso con strumenti manuali, meccanici, foto-ottici, nefelometrici e di altro tipo per il rilevamento dei coaguli. Attenersi alle raccomandazioni del produttore per un uso corretto della strumentazione. Per analisi manuali:

- A. Preiscaldare Thromboplastin-D a 37 °C.
- B. Aggiungere 0,1 mL di plasma per test nella cuvetta e preiscaldare a 37 °C.
- C. Aggiungere 0,2 mL di Thromboplastin-D riscaldato al plasma per test e cronometrare il tempo di formazione dei coaguli.

VI. Controllo qualità

I campioni di plasma normali e anomali come i controlli della coagulazione Pacific Hemostasis livello 1, 2 e 3 devono essere testati congiuntamente ai campioni di plasma ottenuti da pazienti. Il livello 1 corrisponde a un plasma normale liofilizzato. I livelli 2 e 3 vengono corretti per simulare, rispettivamente, plasma moderatamente e gravemente deficitario. Prima di iniziare i test ogni giorno ed almeno una volta ad ogni cambio di turno oppure con ciascun gruppo di analisi, analizzare i controlli normali e anomali. È necessario, inoltre, procedere ad un test dei controlli ad ogni cambio del reagente oppure in caso di importanti regolazioni della strumentazione. Ciascun laboratorio è tenuto a stabilire un range di controllo che rappresenti la variazione ammessa nelle prestazioni giornaliere per ciascun controllo.

VII. Risultati

Arrotondare i tempi di coagulazione relativi a ciascun campione di plasma allo 0,1 secondi più prossimo. È possibile, inoltre, indicare un range di riferimento normale (NRR, Normal Reference Range) per effettuare la comparazione. Non annotare i valori del paziente relativi ai tempi di coagulazione del plasma di controllo disponibili in commercio. I controlli servono esclusivamente a garantire la qualità del sistema di analisi.

Determinazione dell'INR

Un effetto indesiderato della terapia anticoagulante per via orale potrebbe essere rappresentato da una tendenza a sanguinare. Per massimizzare gli effetti terapeutici desiderati e ridurre al minimo il sanguinamento, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) consiglia una procedura per standardizzare il test ed il trattamento. Questa procedura è basata sull'International Normalized Ratio (INR).^{6,7}

L'INR viene calcolato utilizzando il rapporto tra PT del paziente e valore medio del range di riferimento normale (media INRR) in base alla seguente relazione matematica:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT paziente}}{\text{media INRR}} \right)^{\text{ISI}}$$

Ad esempio, con un ISI pari a 1,95 e un valore medio normale pari a 11,9 secondi, l'INR relativo ad un PT di 20,20 secondi viene calcolato come segue:

$$\text{INR} = \left(\frac{20,20}{11,9} \right)^{1,95} = 1,68^{1,95} = 2,7$$

L'International Sensitivity Index (ISI, indice internazionale di sensibilità) misura la sensibilità della strumentazione/tromboplastina ai fattori della coagulazione. I valori ISI vengono assegnati in rapporto ad un materiale di riferimento primario. I reagenti altamente sensibili presentano valori ISI bassi. Conformemente alle

raccomandazioni dell'OMS, i valori INR superiori a 5,5 espongono il paziente a un inutile rischio di complicanze emorragiche. È generalmente consigliato che i pazienti in terapia anticoagulante per via orale stabilizzata mantengano uno di valore di INR pari a 2,0 – 3,5, a seconda delle indicazioni cliniche.² Il valore ISI relativo alla Thromboplastin-D specifico del lotto è riportato sull'etichetta della scatola del kit. (Per ulteriori valori ISI della strumentazione contattare Fisher Diagnostics).

VIII. Limitazioni

L'analisi biochimica della coagulazione comprende una serie di reazioni influenzate da numerose condizioni preesistenti all'analisi. Per ottenere risultati riproducibili è necessario controllare tali variabili.²

Tecnica

- Il pH aumenta se il plasma viene esposto all'aria. Conservare i campioni in contenitori tappati di vetro siliconato oppure di plastica.
- Il plasma mantenuto a 4–8 °C potrebbe subire un'attivazione a freddo riducendo, in tal modo, significativamente il PT.⁴
- Thromboplastin-D è stato ideato per essere utilizzato a 37 °C ± 0,5 °C. Controllare di frequente la temperatura di tutti gli elementi riscaldanti.
- Tutte le attrezzature di laboratorio devono risultare pulite e prive di tracce di detergenti.
- Per una corretta manutenzione attenersi sempre alle istruzioni fornite dal produttore della strumentazione.

Sostanze interferenti

- Ossalato di sodio, EDTA ed eparina non sono indicati come anticoagulanti.
- Il PT può essere prolungato da sostanze quali contraccettivi orali, corticosteroidi, EDTA, asparaginas, clofibrate, eritromicina, etanolo, tetraciclina e anticoagulanti quali eparina e warfarin.⁵
- Il PT può essere ridotto a causa di sostanze quali antistaminici, butabarbitali, caffè, contraccettivi orali, fenobarbital e vitamina K.⁶

IX. Valori attesi

In studi multicentri Thromboplastin-D è stato utilizzato per analizzare una popolazione di pazienti normali ottenendo i seguenti risultati:⁸

Strumento	Media PT (sec)	Range (+/-2SD)	N
Stago STA	11,3	10,4–12,2	129
Amelung KC 4A™	11,8	9,8–13,7	30
MLA™ Electra 1000C™	12,2	10,4–14,1	30

Nota: il range STA normale è stato determinato utilizzando campioni freschi, per tutti gli altri strumenti sono stati utilizzati campioni congelati. Questi valori devono essere utilizzati come riferimento. Ogni laboratorio è tenuto a definire un range di riferimento normale (NRR, Normal Reference Range) utilizzando strumenti, metodi di raccolta del sangue e tecniche di analisi utilizzate in quel laboratorio. L'NRR deve essere ridefinito o perlomeno verificato quando vengono modificati i numeri di lotto dello stesso reagente.^{8,9} Ad ogni cambio di reagente, strumenti, tecniche di raccolta del sangue o anticoagulanti è opportuno definire un nuovo NRR.

X. Caratteristiche prestazionali

La precisione dei risultati del tempo di protrombina dipende da numerosi fattori tra cui la strumentazione, la tecnica ed il reagente utilizzati. La precisione di Thromboplastin-D è stata valutata testando su diversi strumenti un campione di plasma normale ed uno anomalo. I risultati sono riassunti nella seguente tabella.⁸

XI. Riepilogo degli studi di precisione intra-analisi, %CV (N = 20)

Campione	BioMerieux MDA*	MLA Electra 1000C	Amelung KC 4A
Normale	0,8%	0,6%	2,0%
Anomalo	0,9%	1,8%	2,1%

Sensibilità: Thromboplastin-D rileva i deficit nel percorso estrinseco come determinato dal test del tempo di protrombina. La verifica della sensibilità al fattore è stata eseguita diluendo un campione di plasma normale combinato con campioni di plasma con deficit del fattore in modo da ottenere una concentrazione finale del fattore compresa tra 0 e 100%. La verifica del PT di tali campioni è stata eseguita con lo strumento MLA-1000C.¹⁰

Verifica della sensibilità al fattore: Una diluizione del 10% di plasma normale ha ridotto il tempo di protrombina di circa 10 secondi. La diluizione del 20% ha ridotto il tempo di protrombina di circa 20 secondi.

Verifica della specificità: Thromboplastin-D non rileva altri fattori della coagulazione.

XII. Correlazione

Gli studi sulla correlazione sono stati eseguiti con lo strumento MLA-1000C su un reagente per tromboplastina estratta da cervello di coniglio di un altro produttore.¹¹

% Fattore	Tempo di protrombina (sec)			
	Fattore II	Fattore V	Fattore VII	Fattore X
100	10,9	11,3	11,2	11,4
50	10,5	12,6	12,2	13,0
40	10,5	13,1	12,8	13,3
30	10,9	13,8	13,5	14,5
20	11,4	15,2	14,3	15,9
10	13,4	17,6	16,0	19,6
0	34,0	55,9	25,9	108,8

Correlazione: Gli studi sulla correlazione sono stati eseguiti con lo strumento MLA-1000C su un reagente per tromboplastina estratta da cervello di coniglio di un altro produttore.¹¹

Correlazione PT	Correlazione INR
Thromboplastin D vs. Reagente A, N = 101	R = 0,97 y = 0,7406x + 2,945

XIII. Bibliografia

1. Errichetti, A.M., Holden, A., Ansell, J.: *Management of Oral Anticoagulant Therapy: Experience with an Anticoagulation Clinic*. Arch Intern Med. 144:1966-68, 1984.
2. Hirsh, J., Dalen, J.E., Deykin, D., Poller, L.: *Oral Anticoagulants: Mechanisms of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Ther*

Symbols Key / Symbolschlüssel / Légende / Leyenda de símbolos / Legenda dei simboli/ Υπόμνημα συμβόλων	
	Manufacturer Hersteller Fabricant Fabricante Produttore Κατασκευαστής
	In Vitro Diagnostic Medical Device <i>In-vitro-Diagnostikum</i> Matériel médical pour utilisation diagnostique <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnóstico <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροεπιλογικό προϊόν
	Lot Number Chargenbezeichnung Numéro de lot Número de lote Numero di lotto Αριθμός παρτίδας
	Use By Verfallsdatum Utiliser jusqu'à Fecha de caducidad Utilizzare entro Ημερομηνία λήξης
	Temperature Limitation Temperaturgrenzen Limite de température Limites de temperatura Limiti di temperatura Περιορισμός θερμοκρασίας
	CE Mark CE-Kennzeichnung Marquage CE Marcado CE Marcado CE Σήμανση CE
	Catalogue Number Bestellnummer Référence catalogue Número de catálogo Número catalogo Αριθμός καταλόγου
	Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultar las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Συμβουλεύετε τις οδηγίες χρήσης
	Authorized Representative in the European Community Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft Représentant agréé pour la Communauté européenne Representante autorizado en la Comunidad Europea Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα



EC REP

WMDE
Bergerweg 18
6085 AT Horn
The Netherlands



Fisher Diagnostics
a division of Fisher Scientific Company, LLC
a part of Thermo Fisher Scientific Inc.
Middletown, VA 22645-1905 USA
Phone: (800) 528-0494
(540) 869-3200
Fax: (540) 869-8132

Thermo
SCIENTIFIC

JL840799 (R2)