



Pacific Hemostasis® Thromboplastin-DS

I. Intended Use

Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS 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 (FXa). FXa in turn activates Prothrombin to thrombin, which converts fibrinogen to an insoluble fibrin clot.

III. Reagent

For *in vitro* diagnostic use.

Composition: <2% rabbit brain tissue, 0.013% sodium azide, 5% buffers, salts, and stabilizers

Store unopened vials at 2-8°C. Reconstitute with preservative-free distilled/deionized water according to the Thromboplastin-DS 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 is stable for 7 days at 2-8°C, 8 hours at 37°C, and for 24 hours at room temperature (15-25°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-DS 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.

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 fill 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 hematocrits outside the range of 20-55% may be improperly anticoagulated and should be adjusted appropriately.

V. Test Procedure

Materials Provided: Thromboplastin-DS 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-DS 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:

- Prewarm Thromboplastin-DS to 37°C.
- Add 0.1 mL test plasma to cuvette and prewarm to 37°C.
- Forcibly add 0.2 mL warmed Thromboplastin-DS 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).^{6,7}

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

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{Patient PT}}{\text{mean}_{\text{NRR}}} \right) \text{ ISI}$$

For example, with an ISI of 1.00 and a mean normal of 12.0 seconds, the INR for a PT of 40.0 seconds is calculated as follows:

$$\text{INR} = \left(\frac{40.0}{12.0} \right)^{1.00} = (3.33)^{1.00} = 3.33$$

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.² The lot specific ISI value for Thromboplastin-DS can be found on the kit box label. For additional instrument ISI values, call Fisher Diagnostics Technical Services.

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 It has been found that, on occasion, patient samples with INR values above the recommended therapeutic range of 2.0-3.5 may result in a "Coag Error 3" when using ACL instrumentation. If an error message is obtained, the sample should be tested using Thromboplastin-DS on an alternate method.



Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS

I. Verwendungszweck

Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS wird eingesetzt zur Durchführung des einstufigen Prothrombinzeit-Test (PT-Test) und für auf PT-basierte Faktor-Assays.

II. Zusammenfassung und Prinzipien

Der PT-Test eignet sich als Screening-Tool und als quantitativer Test für die Koagulationsfaktoren im extrinsischen und allgemeinen Gerinnungssystem. Dieser Test ist bei Patienten mit erworbener oder angeborenen Störungen verlängert, welche die Aktivität der Faktoren I (Fibrinogen), II (Prothrombin), V, VII und X reduzieren. Der PT wird außerdem weit verbreitet zur Monitorisierung der oralen Antikoagulationstherapie verwendet.^{1,2} Oral Antikoagulanzen reduzieren die Aktivität der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X, Protein C und Protein S) und der PT ist verlängert als eine Resultat.

Der einstufige PT-Test bestimmt die Gerinnungszeit des Plasmas, nachdem ein Gewebefaktor (Thromboplastin) und Kalzium hinzugegeben wurde. Die Rekalibration des Plasmas erzeugt bei vorhandenem Gewebefaktor den aktivierte Faktor Xa (FXa). FXa aktiviert anschließend Prothrombin zu Thrombin, welches das Fibrinogen in ein nicht lösliches Fibringerüst verwandelt.

III. Reagenz

Für die Verwendung in der *in-vitro*-Diagnostik.

Zusammensetzung:

<2% Kaninchenhirn, 0,013% Natriumazid, 5% Puffer, Salze und Stabilisatoren Entsprechend den Angaben auf dem Thromboplastin-DS-Flaschenetikett wieder in konservierungsstofffreies, destilliertes/deionisiertes Wasser einsetzen, vorsichtige Kreisbewegungen machen und die Flasche 15 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen. Die Flasche nicht invertieren oder schütteln. Bei bedenklicher Wasserqualität steht ein Rekonstitutionszettel zur Verfügung. Nach der Rekonstitution ist das verschlossene gelagerte Reagenz nach 7 Tagen und bei einer Lagerung einer Temperatur von 37 °C nach 8 Stunden verwendet werden.⁸ Bei Nichtverwendung bei 2-3 °C lagern. Nicht einfrieren.

Vor jeder Verwendung vorsichtig schütteln. Hierzu eine Vorrichtung verwenden, z. B. einen Magnetrührer, um eine angemessene Aufhängung zu gewährleisten. Fehlendes Vakuum in Flaschen, fehlerhafte Ergebnisse, Qualitätskontrollen außerhalb der festgelegten Bereiche oder Abweichungen in der Farbe des Produkts können auf eine Verschlechterung des Produkts hinweisen. Eine mangelhafte Qualität kann jedoch auch durch andere Faktoren innerhalb des Testsystems begründet sein.

Wichtig: Thromboplastin-DS enthält Natriumazid. In saurer Lösung zerstellt sich Natriumazid in Stickstoffwasserstoffsaure, einem ausgesprochen toxischen Stoff. Azidverbindungen sollten vor der Entsorgung mit fließendem Wasser verdünnt werden. Nach der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen, um die Abdizidung zu verhindern. Diese Vorsichtsmaßnahmen werden empfohlen, um Ablagerungen in Metallrohren zu vermeiden, die zu explosionsgefährlichen Bedingungen führen können.

IV. Probenvorbereitung

Für Koagulationsversuche werden 3.2% (0,109M) des Thrombininhibitoren Trinatriumcitrat empfohlen. Hämolyse und Kontamination durch Gewebeflüssigkeiten vermeiden. Proben mit weniger als 90% des erwarteten Füllvolumens sollten nicht verarbeitet werden. Blut für 15 Minuten bei 1500 x g zentrifugieren. Test innerhalb von 2 Stunden ausführen, wenn die Proben bei 22-24 °C gelagert werden. Wenn der Test nicht innerhalb von 24 Stunden ausgeführt werden kann, sollte das Plasma bei -20 °C bis zu zwei Wochen oder bei -70 °C bis zu 6 Monaten eingefroren werden. Weitere Informationen zur Präparation und Lagerung der Proben finden Sie im NCCLS Dokument H21-A4.³

- Das Mischen des Blutes mit dem Thrombininhibitor sollte sofort erfolgen.
- Eine Schaumbildung ist zu vermeiden.
- Nur Behälter aus Kunststoff oder silikonisiertem Glas verwenden.
- Trübe, ikerische, lipämische oder hämolierte Proben können fehlerhafte Ergebnisse verursachen.
- Das Einfrieren und Auftauen von Residualzellen enthaltendem Plasma verursacht eine Beschädigung der Zellmembranen, die sich auf die Ergebnisse auswirken kann.
- Akute entzündliche Reaktionen können die PT-Ergebnisse aufgrund von erhöhtem Fibrinogen beeinträchtigen.
- Plasmaproben mit Hämatokritwerten außerhalb eines Bereichs von 20-55% wurden wahrscheinlich nicht ordnungsgemäß antikoaguliert und sollten entsprechend angepasst werden.

V. Testverfahren

In Lieferumfang enthaltene Materialien: Thromboplastin-DS Reagent, 10 x 4 mL, 10 x 10 mL oder 10 x 2 mL

Nicht im Lieferumfang enthaltene aber erforderliche Materialien:

Destilliertes oder deionisiertes Wasser oder Pacific Hemostasis Reconstitution Fluid

Stoppuhr oder Zeitgeber

Präzisionspistole: 0,1 und 0,2 mL

Normale und abnormale Kontrollen, z. B. Pacific Hemostasis Coagulation Control, Level 1, 2 und 3. Thromboplastin-DS eignet sich für manuelle, mechanische, photo-optische oder andere Nachweismethoden von Gerinnungssystem. Für eine ordnungsgemäße Verwendung der Instrumentierung sind die Anweisungen des Herstellers zu beachten. Manuelle Versuche:

- Thromboplastin-DS auf 37 °C vorwärmen.
- 0,1 mL Testplasma zur Küvette hinzufügen und auf 37 °C vorwärmen.
- 0,2 mL vorgewärmtes Thromboplastin-DS zum Testplasma hinzufügen und mit einer Stoppuhr messen, wann der Gerinnungsvorgang beginnt.

VI. Qualitätskontrolle

Normale und abnormale Plasmen, z. B. Pacific Hemostasis Coagulation Control Level 1, 2 und 3, sollten zusammen mit Patientenplasmen getestet werden. Level 1 ist ein lyophilisiertes Normalplasma. Level 2 und 3 sind angepasst, um moderat bzw. schwer defizientes Plasma zu imitieren. Bei der Testmittlung sollten normale und abnormale Kontrolle jeden Tag und mindestens einmal pro Schicht oder mit jeder Versuchsreihe durchgeführt werden. Die Kontrollen sollten bei jedem Reagenzwechsel oder einer umfassenden Instrumentenanpassung durchgeführt werden. Jedes Laboratorium sollte einen Kontrollbereich festlegen, der die zulässigen Abweichungen der täglichen Ausführung für alle Kontrollen darlegt.

VII. Ergebnisse

Zeichnen Sie die Gerinnungszeit für jedes Plasma bis auf 0,1 Sekunden genau auf. Zum Vergleich kann auch ein normaler Referenzbereich herangezogen werden. Die Gerinnungszeiten von kommerziellen Kontrollplasmen zur relativen Gerinnungszeit werden nicht dokumentiert. Die Kontrollen dienen nur der Qualitätskontrolle des Testsystems.

Ermittlung des INR-Werts

Eine unerwünschte Folge der oralen Antikoagulationstherapie kann eine Tendenz zur vermehrten Blutung sein. Um den gewünschten therapeutischen Effekt zu maximieren und die Blutungen zu minimieren, wurde der von der WHO (World Health Organization) ein standardisiertes Verfahren im Hinblick auf die Testausführung und Behandlung empfohlen. Dieses Verfahren basiert auf der INR (International Normalized Ratio).^{6,7}

Die INR wird unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Patienten-PT zum Mittelwert eines normalen Referenzbereichs ($\text{Mittel}_{\text{NRR}}$) gemäß der folgenden mathematischen Beziehung ermittelt:

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{Patienten-PT}}{\text{Mittel}_{\text{NRR}}} \right) \text{ ISI}$$

Bei einem ISI (Internationaler Sensitivitäts-Index) von 1,00 und einem mittleren Normalwert von 12,0 Sekunden wird die INR für eine PT von 40 Sekunden beispielweise wie folgt berechnet:

$$\text{INR} = \left(\frac{40,0}{12,0} \right)^{1,00} = (3,33)^{1,00} = 3,33$$

Der Internationale Sensitivitäts-Index (ISI) ist drückt die Thromboplastin/Instrument-Empfindlichkeit im Hinblick auf Koagulationsfaktoren aus. ISI-Werte werden mittels eines Vergleichs zum primären Referenzmaterial erhalten. Hoch empfindliche Reagenzien weisen niedrige ISI-Werte auf. Gemäß den WHO-Empfehlungen setzen INR-Werte über 5,5 den Patienten einem unnötigen Risiko von Blutungskomplikationen aus. Es wird im Allgemeinen empfohlen, dass bei Patienten mit einer stabilisierten oralen Antikoagulationstherapie ein INR-Wert von 2,0 - 3,5 beibehalten werden sollte, wobei dies abhängig von der klinischen Indikation ist.² Der chargenspezifische ISI-Wert für Thromboplastin-DS befindet sich auf dem Verpackungsetikett. Weitere ISI-Werte erhalten Sie bei Fisher Diagnostics Technical Services.

VIII. Grenzen des Verfahrens

Die Biochemie der Koagulation umfasst eine Reihe von Reaktionen, die durch viele Bedingungen zur Testvorbereitung beeinflusst werden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen diese Variablen kontrolliert werden.³ Es hat sich gezeigt, dass Patientenproben mit INR-Werten oberhalb des empfohlenen therapeutischen Bereichs von 2,0 - 3,5 bei Anwendung an einem ACL-Gerät einen «Coag Error 3»-Fehler verursachen. Im Fall dieser Fehlermeldung sollte die Probe mit Thromboplastin-DS unter Verwendung einer anderen Methode getestet werden.

- Wenn das Plasma Luft ausgesetzt wird, erhöht sich der Plasma-pH-Wert. Proben in Behältern aus Kunststoff oder silikonisiertem Glas verwenden.
- Bei 4-8 °C gelagertes Plasma kann eine Aktivierung (Cold Activation) unterlaufen, die eine signifikante Verkürzung der PT folgt.⁴
- Thromboplastin-DS wurde für den Einsatz bei 37 °C ± 0,5 °C entwickelt. Die Temperatur aller Heizelemente muss daher regelmäßig geprüft werden.
- Alle Instrumente müssen gereinigt und frei von Reinigungsmittelrückständen sein.
- Für eine ordnungsgemäße Wartung sind die Anweisungen des Herstellers zu beachten.

Störende Substanzen

- Natriumoxalat, EDTA und Heparin sind keine geeigneten Thrombininhibitoren.
- Die PT kann durch Substanzen wie orale Kontrazeptiva, Corticosteroid, EDTA, Asparaginase, Clofibrat, Erythromycin, Äthanol, Tetracycline und Antikoagulanzen, z. B. Heparin und Warfarin, verlängert werden.⁵
- Die PT kann durch Substanzen wie Antihistamine, Butabital, Koffein, orale Kontrazeptiva, Phenobarbital und Vitamin K verkürzt werden.⁵

IX. Erwartete Werte

Eine Auswertung von Thromboplastin-DS in einer normalen Population ergab die folgenden Ergebnisse:⁹

|
| |



Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS

I. Utilisation prévue

Le test Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS est destiné à être utilisé dans le cadre de la mesure du test TQ (temps de Quick) en une seule opération, ainsi que lors des tests de facteur basés sur le TQ.

II. Résumé et principes de base

Le test TQ sert d'outil de dépistage, et comme dosage quantitatif des facteurs de coagulation des voies intrinsèques et communes. Ce test est prolongé chez les patients souffrant de troubles acquis ou congénitaux réduisant l'activité des facteurs I (fibrinogène), II (protrombine), V, VII et X. Le TQ est également largement utilisé pour surveiller le traitement anticoagulant oral.^{1,2} Les anticoagulants oraux réduisent l'activité des facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K (II, VII, IX, X, protéine C et protéine S), ce qui prolonge d'autant le TQ.

Le TQ en une seule opération mesure le temps de coagulation du plasma après ajout d'une source de facteur tissulaire (thromboplastine) et de calcium. La recalcification du plasma en présence du facteur tissulaire génère un facteur Xa (FXa) activé. Le facteur Xa active à son tour la protrombine en thrombine, qui convertit le fibrinogène en un caillot fibrineux insoluble.

III. Réactif

Pour utilisation diagnostique *in vitro*.

Composition : <2,0 % de tissu cérébral de lapin, 0,013 % d'azide de sodium, 5 % de tampons, sels et stabilisateurs. Stockez les flacons non ouverts entre 2 et 8 °C. Reconstituer avec de l'eau distillée/désionisée sans conservateur, conformément à l'étiquette du flacon Thromboplastin-DS, agiter doucement et laisser le flacon reposer pendant 15 minutes à température ambiante. Ne pas retourner le flacon, ni l'agiter brusquement. Du liquide de reconstitution est disponible si la qualité de l'eau est douteuse. Après reconstitution, le réactif est stable pendant 7 jours s'il est stocké rebouché entre 2 et 8 °C, pendant 8 heures à 37 °C et pendant 24 heures à température ambiante (entre 15 et 25 °C).⁸

Stockez entre 2 et 8 °C lorsqu'il n'est pas utilisé. **Ne pas congeler.** Mélanger doucement avant utilisation. Prévoir un mécanisme, de type agitateur magnétique, pour conserver une suspension adaptée au cours de l'utilisation. Un manque de vide dans les flacons, des résultats aberrants, des valeurs de contrôle en dehors des intervalles établis ou des variations de couleur du produit peuvent indiquer une détérioration. Cependant, d'autres facteurs relatifs au système de test peuvent être à l'origine de résultats médiocres.

Attention : Le test Thromboplastin-DS contient de l'azide de sodium. Dans un environnement acide, l'azide de sodium produit de l'acide hydrazoïque, composé extrêmement toxique. Les composés à base d'azide doivent être dilués dans de grandes quantités d'eau. Ces précautions sont indispensables pour éviter les dépôts dans les conduites métalliques, qui peuvent produire des composés explosifs.

IV. Prélèvement d'échantillon

Il est recommandé d'ajouter 3,2 % (0,109 M) de citrate trisodique comme anticoagulant lors des tests de coagulation. Éviter l'hémolyse et la contamination par des liquides tissulaires. Les échantillons qui atteignent moins de 90 % du volume de remplissage recommandé doivent être éliminés. Centrifuger le sang pendant 15 minutes à 1500 x g. Effectuer le test dans les 2 heures si les échantillons sont conservés entre 22 et 24 °C. Si le test n'est pas effectué dans les 24 heures, le plasma doit être congelé à -20 °C pendant deux semaines maximum ou à -70 °C pendant 6 mois maximum. Pour plus de détails sur le prélèvement d'échantillon et le stockage, consulter le Document H21-A4 de la NCCLS.³

- Mélanger sans délai le sang et les anticoagulants.
- Éviter la formation de mousse dans l'échantillon.
- Ne pas utiliser des récepteurs en plastique ou en verre siliconé.
- Les échantillons troubles, icteriques, lipidiques ou hémolysés peuvent donner des résultats erronés.
- Tous les échantillons de plasma congelés ou en cours de décongélation qui contiennent des cellules résiduelles produisent des membranes cellulaires abîmées qui peuvent altérer les résultats.
- Des réactions inflammatoires aiguës peuvent raccourcir le TQ à cause d'un taux élevé de fibrinogène.
- Tous les échantillons de plasma affichant des taux d'hémocrite inférieurs à 20 % et supérieurs à 55 % sont susceptibles d'être mal traités par anticoagulant, et doivent être corrigés en conséquence.

V. Procédure de test

Matériel fourni : Thromboplastin-DS Reagent, 10 x 4 mL, 10 x 10 mL ou 10 x 2 mL.

Matériel nécessaire mais non fourni : Eau distillée ou désionisée, ou Pacific Hemostasis Reconstitution Fluid.

Chromométrique ou minuterie

Pipette de précision : 0,1 et 0,2 mL

Contrôles normaux et anormaux, tels que les plasmas de Pacific Hemostasis Coagulation Control Plasmas, Level 1, 2 et 3

La Thromboplastin-DS peut être utilisée avec des instruments à détection de caillots, qu'ils soient manuels, mécaniques, à cellule photoélectrique, néphélographiques ou de tout autre type. Suivre les recommandations du fabricant pour utiliser correctement les instruments. Pour les dosages manuels :

- Préchauffer la Thromboplastin-DS à 37 °C.
- Ajouter 0,1 mL de plasma à analyser à la cuvette et préchauffer à 37 °C.
- Ajouter 0,2 mL de Thromboplastin-DS préchauffé au plasma et chronométrier la formation des caillots.

VI. Contrôle qualité

Les contrôles normaux et anormaux, tels que les plasmas de Pacific Hemostasis Coagulation Control, Level 1, 2 et 3 doivent être analysés en association avec les échantillons de plasma des patients. Le Level 1 est un plasma normal lyophilisé. Les Levels 2 et 3 sont conçus pour reproduire les échantillons de plasma légèrement et fortement déficients respectivement. Des contrôles normaux et anormaux doivent être effectués quotidiennement en début d'analyse, et au moins une fois lors de chaque utilisation, ou avec chaque groupe d'analyses. Les contrôles doivent également être testés avec chaque nouveau réactif, ou après chaque réglage important des instruments. Chaque laboratoire doit définir l'intervalle pour chaque groupe de contrôle afin de représenter les variations autorisées dans les résultats au jour le jour, pour chaque contrôle.

VII. Résultats

Noter les temps de coagulation de chaque échantillon de plasma, arrondis au dixième de seconde le plus proche. À titre de comparaison, un intervalle de référence normale peut également être défini. Ne pas comparer les valeurs des patients aux temps de coagulation des contrôles de plasma fournis. Les contrôles ne sont destinés qu'à l'assurance qualité du système de test.

Détermination de l'INR

Les traitements anticoagulants oraux peuvent avoir des effets indésirables tels une tendance au saignement. Afin d'optimiser les effets thérapeutiques et de minimiser les saignements, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) a recommandé une procédure de standardisation des tests et des traitements. Cette procédure est basée sur le rapport international normalisé (INR).^{6,7}

L'INR est calculé à l'aide du ratio TQ patient / moyenne de l'intervalle de référence normale (moyenne_{PRN}), d'après la relation mathématique suivante :

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TQ patient}}{\text{moyenne}_{\text{PRN}}} \right) \text{ ISI}$$

Par exemple, avec un ISI de 1,00 et une moyenne normale de 12,0 secondes, l'INR d'un TQ de 40,0 secondes se calcule comme suit :

$$\text{INR} = \left(\frac{40,0}{12,0} \right)^{1,00} = (3,33)^{1,00} = 3,33$$

L'indice de sensibilité international (ISI) est une mesure de la sensibilité de l'instrument/de la thromboplastine aux facteurs de coagulation. Les valeurs ISI sont affectées par comparaison avec un matériel de référence. Les réactifs à haute sensibilité présentent des valeurs ISI faibles. Conformément aux recommandations de l'OMS, les valeurs INR supérieures à 5,5 peuvent exposer le patient à des risques inutiles de complications hémorragiques. On admet généralement que les patients sous traitement anticoagulant oral stabilisé doivent conserver un INR entre 2,0 et 3,5, en fonction des indications cliniques.² La valeur ISI spécifique au lot pour la Thromboplastin-DS est indiquée sur l'étiquette de la boîte du kit. Pour connaître les valeurs ISI d'autres instruments, contacter Fisher Diagnostics Technical Services.

VIII. Limites

La biologie de la coagulation implique une série de réactions influencées par diverses conditions préalables au test. Ces variables doivent être contrôlées afin d'obtenir des résultats reproduisables.³ Il a été constaté que les échantillons de patients présentent des valeurs INR supérieures à la plage thérapeutique recommandée (2,0–3,5)² généralement parce qu'une erreur de type "Coag Error 3" sur les instruments ACL. Lorsqu'un tel message d'erreur apparaît, l'échantillon doit être testé avec Thromboplastin-DS en utilisant une autre méthode.

FRANÇAIS



Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS

I. Uso previsto

La Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS se utiliza para pruebas de tiempo de protrombina en una sola etapa y para la valoración de factores basados en TP.

II. Resumen y fundamento

El tiempo de protrombina se utiliza como prueba discriminativa y como prueba cuantitativa para determinar los factores de coagulación en las vías extrínsecas y común. 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 tiempo de protrombina también se utiliza para controlar los tratamientos con anticoagulante por vía oral^{1,2}. Los anticoagulantes administrados por vía oral reducen la actividad de los factores de coagulación vitamina K dependientes (II, VII, IX, X, Proteína C y Proteína S), dando como resultado la prolongación del tiempo de protrombina.

III. Valeurs escomptées

Lors de l'évaluation du Thromboplastin-DS dans différents sites sur une population normale, on obtient les résultats suivants :⁹

Instrument	Moyenne TQ (secondes)	Plage (+/- 2 ET)	N
MLA™ Electra 1000CTM	13,2	11,4–15,0	40
MLA™ Electra 900CTM	13,7	12,4–15,0	20
IL ACL™ 300/3000+	10,5	8,9–12,1	61
Amelung KC 10TM	12,7	9,3–14,2	20
Pacific Hemostasis ThromboScreen 400C	13,5	12,2–14,8	38
Pacific Hemostasis ThromboScreen 200	13,5	12,0–15,1	60

Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif. Chaque laboratoire doit élaborer plage un intervalle de référence normal (PRN), en utilisant les instruments, les méthodes de prélèvement sanguin et les techniques de test qui lui sont propres. La PRN doit être mise à jour, ou du moins vérifiée, en cas de changement du numéro de lot d'un même réactif.^{3,6} Tout changement de réactif, d'instruments, de technique de prélèvement sanguin o/ d'anticoagulants implique l'élaboration d'une nouvelle PRN.

Le temps de coagulation des échantillons de plasma anormaux dépend de l'ISI du lot de réactif utilisé.

X. Caractéristiques de performance

Précision : La précision des résultats du Prothrombin Time dépend de nombreux facteurs, tels l'instrument, la technique et le réactif utilisés. La précision de la Thromboplastin-DS a été vérifiée par des tests sur plasma normal et anormal, en utilisant différents instruments. Un résumé des résultats est présenté ci-dessous.¹⁰

Résumé des études de précision par test, % CV (N = 20)

Echantillon	MLA Electra 1000C	ThromboScreen 400C	ThromboScreen 200	Amelung KC10
Normal	1,1 %	1,9 %	1,9 %	2,9 %
Anormal	2,8 %	2,5 %	2,3 %	1,1 %

Sensibilité : La Thromboplastin-DS détecte les déficiences de la voie extrinsèque tel que déterminées par le Prothrombin Time test. Le test de la sensibilité au facteur a été effectué en diluant des pools d'échantillons de plasma normal avec du plasma présentant un déficit en facteur, de sorte que la concentration finale du facteur soit comprise entre 10 et 100 %. Le Test TQ de ces échantillons a été effectué sur l'instrument MLA-1000C.¹¹

% Facteur	Prothrombin Time (secondes)			
	Facteur II	Facteur V	Facteur VII	Facteur X
100	11,6	11,6	11,8	11,7
50	11,6	13,2	12,6	12,8
40	11,7	13,9	12,8	13,3
30	12,3	14,9	13,5	14,1
20	12,8	15,9	13,9	14,8
10	14,1	18,3	15,2	17,0

Corrélation : Les études de corrélation ont été effectuées avec deux réactifs thromboplastine sensibles via un test TQ sur des échantillons normaux et anormaux. Le test a été effectué sur l'instrument Stago STA.¹²

Thromboplastin DS vs.	Corrélation TQ	Corrélation INR
Réactif A, N = 49	R = 0,98 y = 1,06x + 1,30	R = 0,98 y = 0,89x + 0,05
Réactif B, N = 49	R = 0,95 y = 0,91x + 2,20	R = 0,95 y = 0,82x + 0,10

XI. Références

- Erchetti, A.M., Holden, A., Ansell, J.: *Management of Oral Anticoagulant Therapy: Experience with an Anticoagulation Clinic*. Arch Intern Med. 144:1966-68, 1984.
- Hirsch, J., Dalen, J.E., Deykin, D., Poller, L.: *Oral Anticoagulants: Mechanisms of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range*. Chest 102(Suppl): 312S-316S, 1992.
- NCCLS: *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays: Approved Guideline*. NCCLS document H21-A4. NCCLS, Wayne, PA, 2003.
- Palmer, R.N., Gralnick, H.R.: *Inhibition of the Cold Activation of Factor VII and the Prothrombin Time*. Am J Clin Path. 81: 618-622, 1984.
- Young, D.S., Thomas, D.W., Friedman, R.B., et al: *Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests*. Clin Chem 18:1041, 1972.
- Dalen,



Pacific Hemostasis

Thromboplastin-DS

I. Uso previsto

La Pacific Hemostasis Thromboplastin-DS può essere utilizzata per eseguire il Prothrombin Time test (PT) e per le analisi basate su PT.

II. Riepilogo e principi del test

Il PT viene utilizzato come strumento di screening e come test quantitativo per i fattori di coagulazione della via extrinseca e comune. Il tempo di PT è prolungato nei pazienti affetti da patologie congenite o acquisite che riducono l'attività dei fattori I (fibrinogeno), II (protrombina), V, VII e X. Il PT viene, inoltre, largamente utilizzato per monitorare la terapia anticoagulante per via orale.^{1,2} Gli anticoagulanti assunti per via orale riducono l'attività della vitamina K in base ai fattori di coagulazione (II, VII, IX, X, proteina C e proteina S) con conseguente prolungamento del PT.

Il PT misura il tempo di coagulazione del plasma dopo aver aggiunto il 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 fibrina insolubile.

III. Reagente

Per diagnostica *in vitro*.

Composizione: <2 % tessuto cerebrale di cingolo, 0,013 % sodio azide, 5 % tamponi, sali e stabilizzanti.

Conservare le fiale chiuse a 2–8 °C. Ricostituire con acqua deionizzata/distillata priva di conservanti come riportato sull'etichetta della fiala di Thromboplastin-DS, agitare dolcemente e lasciare riposare la fiala a temperatura ambiente per 15 minuti. Non capovolgere o agitare con forza la fiala. In caso di dubbi circa la qualità dell'acqua è disponibile un liquido per la ricostituzione (Reconstitution Fluid). Una volta eseguita la ricostituzione, il reagente si mantiene stabile per 7 giorni se conservato a 2–8 °C e per 8 ore se conservato a 37 °C e per 24 ore se conservato a temperatura ambiente (15–25 °C). Conservare a 2–8 °C se non viene utilizzato. **Non congelare.**

Agitare dolcemente prima dell'uso. Per mantenere una sospensione adeguata durante il prolungamento qualche meccanismo come ad es. un agitatore magnetico. Perdita di vuoto nelle fiale, valori errati, valori del controllo di qualità oltre i limiti stabili oppure alterazioni del colore del prodotto potrebbero indicarne un deterioramento. In ogni caso, prestazioni scadenti potrebbero essere dovute ad altri fattori legati al sistema di test.

Avvertenza: La Thromboplastin-DS contiene sodio azide. Il sodio azide in condizioni acute rilascia acido idrazoico, un componente altamente tossico. Prima di smaltire i composti di azide diluirli con acqua corrente. Per smaltire i composti di azide sciaccuarli con abbondante acqua. Queste precauzioni servono ad impedire la formazione di depositi nei tubazioni metalliche in cui potrebbero svilupparsi delle condizioni esplosive.

IV. Raccolta dei campioni

Per il test sulla coagulazione si raccomanda l'uso di anticoagulante al citrato trisodico al 3,2 % (0,109 M). Evitare l'emolisi e la contaminazione da parte di liquidi tissutali. Non utilizzare i campioni con un volume di riempimento previsto inferiore al 90 %. Centrifugare il sangue per 15 minuti a 1500 x g. Testare entro 2 ore se i campioni si sono mantenuti a 22–24 °C. Se il test non viene completato entro le 24 ore, congelare il plasma a -20 °C per un massimo di 2 settimane oppure a -70 °C per un massimo di 6 mesi. Per ulteriori dettagli circa la raccolta e la conservazione dei campioni vedere il documento NCCLS H21-A4.³

- Non ritardare la miscelazione del sangue con l'anticoagulante.
- Evitare la formazione di schiuma nei campioni.
- Utilizzare esclusivamente contenitori di vetro siliconati oppure in plastica.
- I campioni torbidi, itterici, lipemicci oppure emolitici potrebbero dare luogo a risultati errati.
- Il congelamento e lo scongelamento del plasma contenente cellule residue può danneggiare le membrane delle cellule compromettendo i risultati.
- Reazioni infiammatorie acute possono ridurre il valore del PT a causa dell'aumentata quantità di fibrinogeno.
- Campioni di plasma con ematocrito non compreso tra 20–55 % potrebbero non rispondere correttamente al test di coagulazione e dovranno essere opportunamente corretti.

V. Procedura del test

Materiali in dotazione: Thromboplastin-DS Reagent, 10 x 4 mL, 10 x 10 mL oppure 10 x 2 mL

Materiali necessari, ma non in dotazione:

Acqua distillata o deionizzata oppure Pacific Hemostasis Reconstitution Fluid

Cronometro o timer

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

Controlli normali ed anomali quali campioni di Pacific Hemostasis Coagulation Control Plasmas, Level 1, 2 e 3

La Thromboplastin-DS è indicata per l'uso con metodi di rilevamento del coagulo manuale, meccanico, foto-ottico, nefelometrico oppure di altro tipo. Per un corretto utilizzo della strumentazione attenersi alle raccomandazioni della ditta produttrice. Per le analisi manuali:

- A. Preiscaldare la Thromboplastin-DS a 37 °C.
- B. Aggiungere 0,1 mL di plasma da testare nella cuvetta e preiscaldare a 37 °C.
- C. Aggiungere 0,2 mL di Thromboplastin-DS riscaldato al plasma da testare e cronometrare il tempo di formazione del coagulo.

VI. Controllo della qualità

Insieme al campione di plasma dei pazienti testare sempre anche i campioni di plasma normale ed anomale quali i campioni di Pacific Hemostasis Coagulation Control, Levels 1, 2 e 3. Il Level 1 corrisponde ad un plasma normale lievitato. I Levels 2 e 3 vengono corretti per simulare, rispettivamente, plasma con deficit moderati e gravi. Prima di iniziare i test ogni giorno ed almeno una volta ad ogni cambio di turno oppure con ciascun gruppo di test, procedere al controllo normale e anomalo. È necessario, inoltre, procedere ad un'analisi dei controlli ad ogni cambio del reagente oppure in occasione 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 vicino. È possibile, inoltre, indicare un range di riferimento normale (NRR, Normal Reference Range) per effettuare la comparazione. Non annotare i valori del paziente relativi a tempi di coagulazione del plasma di controllo commerciali. 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 si basa sull'International Normalized Ratio (INR).^{5,7}

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

$$INR = \left(\frac{PT_{\text{paziente}}}{PT_{\text{mediaNRR}}} \right)^{1.00}$$

Ad esempio, con un ISI pari a 1,00 ed il valore medio normale pari a 12,0 secondi, l'INR relativo ad un PT pari a 40,0 secondi viene calcolato come segue:

$$INR = \left(\frac{40.0}{12.0} \right)^{1.00} = (3.33)^{1.00} = 3.33$$

L'International Sensitivity Index (ISI) misura la sensibilità della strumentazione/tromboplastina ai fattori di coagulazione. I valori ISI vengono assegnati in rapporto ad un materiale di riferimento primario. I reagenti altamente sensibili presentano dei valori ISI bassi. Conformemente alle raccomandazioni dell'OMS, i valori INR superiori a 5,5 espongono il paziente al rischio di complicanze emorragiche. È generalmente noto che i pazienti in terapia anticoagulante per via orale stabilizzata debbano mantenere un valore di INR pari a 2,0–3,5, a seconda delle indicazioni cliniche.² Il valore ISI relativo alla Thromboplastin-DS specifico del lotto è riportato sull'etichetta della scatola del kit. Per ulteriori valori ISI della strumentazione contattare il Servizio di assistenza tecnica Fisher Diagnostics Technical Services.

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. È stato notato che talvolta i campioni di pazienti con valori INR oltre l'intervallo terapeutico raccomandato di 2,0–3,5² possono dar luogo ad un "Errore di coagulazione" 3° nel caso in cui si sia utilizzata la strumentazione ACL. In caso di messaggio di errore è necessario testare il campione con Thromboplastin-DS utilizzando un metodo alternativo.

Tecnica

- Il pH aumenterà se il plasma viene esposto all'aria. Conservare i campioni chiusi in contenitori di vetro siliconato oppure di plastica.

ITALIANO

- Il plasma mantenuto a 4–8 °C potrebbe subire un'attivazione a freddo riducendo, in tal modo, il PT.⁴
- La Thromboplastin-DS è stata studiata per essere utilizzata a 37 °C ± 0,5 °C. Verificare 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 dalla ditta produttrice della strumentazione.

Sostanze interferenti

- Ossalato di sodio, EDTA ed eparinina non sono additi come anticoagulanti.
- Il PT può essere prolungato da sostanze quali contraccettivi orali, corticosteroidi, EDTA, asparaginasi, clofibrato, eritromicina, etanolo, tetraciclina e anticoagulanti quali eparinina e warfarin.⁵
- Il PT può essere ridotto a causa di sostanze tra cui antistaminici, butabarbitale, caffefina, contraccettivi orali, fenobarbital e vitamina K.⁵

IX. Valori attesi

Dalla valutazione della Thromboplastin-DS su una popolazione normale eseguita in studi multicentrici sono emersi i seguenti risultati:⁹

Strumento	PT medio (sec.)	Intervallo (+/-2DS)	N
MLA™ Electra 1000™	13,2	11,4–15,0	40
MLA™ Electra 900™	13,7	12,4–15,0	20
IL ACL™ 300/3000+	10,5	8,9–12,1	61
Amelung KC 10™	12,7	9,3–14,2	20
Pacific Hemostasis ThromboScreen 400C	13,5	12,2–14,8	38
Pacific Hemostasis ThromboScreen 200	13,5	12,0–15,1	60

Questi valori vanno considerati esclusivamente come linee guida. Ciascun laboratorio deve stabilire un range di riferimento normale (NRR) utilizzando la strumentazione, i metodi di raccolta del sangue e le tecniche di analisi in uso nel proprio laboratorio. Il NRR deve essere nuovamente stabilito o verificato almeno ad ogni cambio del numero di lotto dello stesso reagente.^{3,6} Stabilire un nuovo NRR ad ogni cambio di reagente, strumentazione, tecniche di raccolta del sangue o di anticoagulante.

Il tempo di coagulazione del plasma anormale dipende dall'ISI del lotto di reagente in uso.

X. Caratteristiche delle prestazioni

Precisione: la precisione di risultati del Prothrombin Time dipende da numerosi fattori tra cui la strumentazione, la tecnica ed il reagente utilizzati. La precisione della Thromboplastin-DS deve essere accertata testando su diversi strumenti un campione di plasma normale ed uno anomale. Segue un riepilogo dei risultati.¹⁰

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

Campione	MLA Electra 1000C	ThromboScreen 400C	ThromboScreen 200	Amelung KC10
Normale	1,1%	1,9%	1,9%	2,9%
Anomale	2,8%	2,5%	2,3%	1,1%

Sensibilità: la Thromboplastin-DS rileva i deficit nella via extrinseca come determinato da Prothrombin Time test. La verifica della sensibilità è stata eseguita diluendo un campione di plasma normale combinato con campioni di plasma carenti in modo da ottenere una concentrazione finale compresa tra 10 e 100 %. La verifica del PT di tali campioni è stata eseguita con lo strumento MLA-1000C.¹¹

% Fattore	Prothrombin Time (sec.)			
	Fattore II	Fattore V	Fattore VII	Fattore X
100	11,6	11,6	11,8	11,7
50	11,6	13,2	12,6	12,8
40	11,7	13,9	12,8	13,3
30	12,3	14,9	13,5	14,1
20	12,8	15,9	13,9	14,8
10	14,1	18,3	15,2	17,0

Correlazione: studi di correlazione sono stati eseguiti rispetto ad altri due reagenti sensibili alla tromboplastina eseguendo un test PT su campioni normali ed anomali. Il test è stato eseguito con lo strumento Stago STA.¹²

Thromboplastin-DS rispetto a	Correlazione PT		Correlazione INR	
	R = 0,98	y = +1,16x + 1,30	R = 0,98	y = 0,89x + 0,05
Thromboplastin-DS rispetto a	R = 0,95		R = 0,95	
	R =			