

TROMBOPLASTINA DS

Tempo di Protrombina secondo Quick (PT)

REF. 1001 10x 4 ml
REF. 1001/12 12x 4 ml
REF. 1016 10x10 ml
REF. 1016/12 12x10 ml



AZIENDA CERTIFICATA DNV

UNI EN ISO 9001:2008
UNI EN ISO 13485:2012



PRINCIPIO

Il PT viene utilizzato come strumento di screening e come test quantitativo per i fattori di coagulazione della via estrinseca a 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. 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.

CAMPIONE

Plasma in citrato trisodico al 3.2 % (0.109 M).

Evitare l'emolisi e la contaminazione da parte di liquidi tissutali. 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.

COMPONENTI FORNITI

Reagente Liofilo	Tessuto cerebrale di coniglio Tamponi Sodio azide	2 % 5 % 0.013 %
------------------	---	-----------------------

Il reagente è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta se conservato ben chiuso a 2-8°C.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Ricostituire il contenuto di un flacone di Reagente con 4 ml (Ref. 1001) o 10 ml (Ref. 1016) di acqua distillata.

Agitare delicatamente e lasciar riposare a temperatura ambiente per 15 minuti. Una volta eseguita la ricostituzione, il reagente si mantiene stabile per 7 giorni se conservato a 2-8°C, per 24 ore a temperatura ambiente (15-25°C) e per 8 ore a 37 °C. **Non congelare.**

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Il reagente può contenere componenti non reattivi e conservanti di varia natura. A scopo cautelativo è opportuno evitare il contatto con la pelle e l'ingestione. Utilizzare le normali precauzioni previste in laboratorio.

Smaltire i rifiuti secondo le norme locali vigenti.

PROCEDIMENTO

Dispensare il campione in una provetta di plastica o in vetro siliconato come riportato nello schema:

Campione	100 µl
Incubare circa 2 minuti a 37°C. Aggiungere:	
Reagente (preriscaldato a 37°C)	200 µl
Cronometrare il tempo di formazione del coagulo.	

Effettuare la determinazione in doppio (la differenza tra i due tempi non deve risultare superiore al 5 %, in caso contrario effettuare un terzo test).

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il Tempo di Protrombina si può esprimere in tre modi: **Percentuale (Fattore di Quick); Ratio; I.N.R. (International Normalized Ratio).**

1. PERCENTUALE

Preparare 5 diluizioni scalari di un pool di plasmi normali come da tabella:

Diluizione	Nessuna	1+2	1+2	1+3	1+7
Valore %	100 %	50%	33%	25%	12.5%
Plasma	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
NaCl 9 g/l	-	0.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	3.5 ml

Di ogni diluizione determinare il tempo di coagulazione in doppio o triplo, con 4 o 5 diluizioni (in funzione di quanto previsto dallo strumento in uso).

Costruire una curva di taratura riportando le percentuali contro i rispettivi tempi.

2. RATIO

Tempo di Protrombina (Campione in esame)

$$\text{RATIO} = \frac{\text{Tempo di Protrombina (Campione in esame)}}{\text{Tempo di Protrombina (Pool Plasmi normali)}}$$

3. I.N.R. = RATIO^{ISI}

Per standardizzare il Test, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) consiglia di esprimere i risultati come INR.

L'INR viene calcolato partendo dal valore della RATIO secondo la formula:

$$\text{I.N.R.} = \text{RATIO}^{\text{ISI}}$$

Ad esempio con un ISI = 1 ed un valore di RATIO = 3.2, l'INR sarà:

$$\text{I.N.R.} = (3.2)^1 = 3.2$$

L'ISI (International Sensitivity Index) 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 particolarmente sensibili hanno un valore ISI basso.

Conformemente alle raccomandazioni dell'OMS, i valori INR superiori a 5.5 espongono il paziente a rischio di complicanze emorragiche. I pazienti in terapia anticoagulante per via orale stabilizzata devono mantenere un INR compreso tra 2 e 3.5 a seconda delle indicazioni cliniche.

Il valore ISI è specifico per ogni lotto di Tromboplastina.

LIMITAZIONI

Tecnica

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

Il plasma mantenuto a 4-8°C potrebbe subire un'attivazione a freddo riducendo, in tal modo, il PT.

La Tromboplastina 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.

Sostanze interferenti

Ossalato di sodio, EDTA ed eparina non sono adatti come anticoagulanti.

Il PT può essere prolungato da sostanze quali contraccettivi orali, corticosteroidi, EDTA, asparaginasi, eritromicina, etanolo, tetraciclina, eparina. Il PT può essere ridotto a causa di sostanze tra cui antistaminici, butabarbitala, caffeina, contraccettivi orali, fenobarbitala e vitamina K.

VALORI ATTESI

Dalla valutazione della Tromboplastina DS su una popolazione normale eseguita in studi multicentri sono emersi i seguenti risultati:

Strumento	PT medio (sec)	Intervallo (+/-2DS)	N
MLA™ Electra 1000C™	13.2	11.4 – 15.0	40
MLA™ Electra 900C™	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. 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.

CONTROLLO DI QUALITA'

E' opportuno eseguire unitamente al campione anche un controllo normale ed uno patologico ad ogni utilizzo del kit.

PRESTAZIONI DEL METODO

Precisione: la precisione di risultati del Tempo di Protrombina dipende da numerosi fattori tra cui la strumentazione, la tecnica ed il reagente utilizzato. La precisione della Tromboplastina DS deve essere accertata testando su diversi strumenti un campione di plasma normale ed uno anormale. Segue un riepilogo dei risultati.

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 %
Anormale	2.8 %	2.5 %	2.3 %	1.1 %

Sensibilità: la Tromboplastina DS rileva i deficit nella via estrinseca come determinato dal test del Tempo di Protrombina. 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.

Tempo di Protrombina (sec)				
% Fattore	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 anormali.

	Correlazione PT	Correlazione INR
Tromboplastina DS rispetto a Reagente A, (N=49)	R = 0.98 y = 1.16x + 1.30	R = 0.98 y = 0.89x + 0.05
Tromboplastina DS rispetto a Reagente B, (N=49)	R = 0.95 y = 1.01x + 2.20	R = 0.95 y = 0.82x + 0.10

BIBLIOGRAFIA

1. Errichetti A. M., Holden A., Ansell J.: Management of Oral Anticoagulant Therapy. Experience with an Anticoagulation Clinic. Arch Inter Med 144, 1966-68, 1984.
2. Hirsh 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.

3. 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
4. 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.
5. Young D.S., Thomas D.W., Friedman R.B. et al: Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Clin. Chem. 18: 1041, 1972.
6. Dalen J. E., Hirsh J.: American College of Chest Physicians and the National Health, Lung, and Blood Institute National Conference on Antithrombotic Therapy. Arch. Inter. Med. 146, 462 – 472, 1966.
7. Palaereti G., Coccheri S., Poggi M. et al: Oral Anticoagulant Therapy Control; Evidence that the INR Expression Improves the interlaboratory Comparability of Results. The Bologna Oral Anticoagulant Control Exercise. Thromb Haemostasis 58:905-910, 1987.

THROMBOPLASTIN DS

Prothrombin Time according Quick (PT)

REF. 1001 10x 4 ml
REF. 1001/12 12x 4 ml
REF. 1016 10x10 ml
REF. 1016/12 12x10 ml



DNV CERTIFIED COMPANY

UNI EN ISO 9001:2008
UN EN ISO 13485:2012



PRINCIPLE

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. 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 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, which converts fibrinogen to an insoluble fibrin clot.

SAMPLE

Plasma in trisodium citrate 3.2 % (0.109 M).

Avoid hemolysis and contamination by tissue fluids. Centrifuge blood for 15 minutes at 1500 x g. Test within 2 hours se 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 2 weeks or at -70 °C for up to 6 months.

KIT COMPONENTS

Reagent	Rabbit brain tissue	2 %
Lyophilized	Buffers	5 %
	Sodium azide	0.013 %

The reagent is stable until the expiration date indicated on the label if stored tightly closed at 2-8°C.

REAGENT PREPARATION

Reconstitute the vial of Reagent with 4 ml (Ref. 1001) or 10 ml (Ref. 1016) of distilled water.

Mix gently and let the vial stand undisturbed for 15 minutes at room temperature. After reconstitution, the reagent is stable for 7 days if stored at 2-8°C, for 24 hours at room temperature (15-25°C) and for 8 hours at 37 °C.

Do not freeze

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Reagent may contain some non-reactive and preservative components. It is suggested to handle carefully it, avoiding contact with skin and swallow.

Use the normal precautions required in the laboratory.

Dispose of waste according to local laws.

PROCEDURE

Dispense the sample into a plastic tube or siliconized glass as shown in the scheme:

Sample	100 µl
Incubate for about 2 minutes at 37°C. Add:	
Reagent (prewarmed at 37°C)	200 µl
Time clot formation.	

Test in duplicate (the difference between 2 values must be $\leq \pm 5$ %, otherwise make a third test).

RESULTS INTERPRETATION

It's possible to word Prothrombin Time in three ways: **Percentage (Quick Factor); Ratio; I.N.R. (International Normalized Ratio).**

1. PERCENTAGE

Prepare 5 dilutions of a pool of normal plasma as in the table:

Dilution	No one	1+ 2	1+2	1+3	1+7
Value %	100 %	50%	33%	25%	12.5%
Plasma	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
NaCl 9 g/l	-	0.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	3.5 ml

Of each dilution time clot formation in duplicate or in triplicate with 4 or 5 dilutions (according to the instrument in use).

2. RATIO

Prothrombin Time (Sample)

$$\text{RATIO} = \frac{\text{Prothrombin Time (Sample)}}{\text{Prothrombin Time (Pool Normal Plasmas)}}$$

3. I.N.R. = RATIO^{ISI}

To standardize testing, the World Health Organization (WHO) recommends to word the results as INR.

The INR is calculated using the RATIO value according to the following relationship:

$$\text{I.N.R.} = \text{RATIO}^{\text{ISI}}$$

For example, with an ISI = 1 and a RATIO = 3.2, INR will be:

$$\text{INR} = (3.2)^1 = 3.2$$

The ISI (International Sensitivity Index) 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 - 3.5 depending on the clinical indication.

The ISI value is specific for each Thromboplastin batch.

LIMITATIONS

Technique

The 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 DS was designed to work at 37°C \pm 0.5°C. Frequently check the temperature of all heating elements.

All labware must be clean and free of trace amounts of detergents.

Interfering Substances

Sodium oxalate, EDTA, and heparin are not suitable anticoagulants.

The PT may be prolonged by substances such as oral contraceptives, corticosteroids, EDTA, asparaginase, erythromycin, ethanol, tetracycline, heparin.

The PT may be shortened by substances including antihistamines, butabarbital, caffeine, oral contraceptives, phenobarbital, and vitamin K.

EXPECTED VALUES

In multi-center studies, when Thromboplastin DS was evaluated on a normal population, the following results were obtained:

Instrument	PT mean (secs)	Range (+/-2SD)	N
MLA™ Electra 1000C™	13.2	11.4 – 15.0	40
MLA™ Electra 900C™	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

These values are intended as a guideline only. Each laboratory should establish a Normal Reference Range (NRR) using instrumentation, blood collection methods, and testing techniques used in that laboratory. The NRR should be reestablished or at least verified when changing lot numbers of the same reagent. A new NRR should be established with any change in reagents, instrumentation, blood collection techniques, or anticoagulant.

The clotting time of abnormal plasmas will depend on the ISI of the reagent lot in use.

QUALITY CONTROL

Normal and abnormal plasmas should be tested in conjunction with patient plasmas.

PERFORMANCE

Precision: Precision of Prothrombin Time results is dependent on many factors, such as the instrument, technique and the reagent in use. Thromboplastin DS precision was assessed by testing a normal and abnormal plasma on several different instruments. A summary of the results follows.

Precision within-run, %CV (N=20)

Sample	MLA Electra 1000C	ThromboScreen 400C	ThromboScreen 200	Amelung KC10
Normal	1.1 %	1.9 %	1.9 %	2.9 %
Abnormal	2.8 %	2.5 %	2.3 %	1.1 %

Sensitivity: Thromboplastin DS detects deficiencies in the extrinsic pathway as determined by the Prothrombin Time test. Factor sensitivity testing was performed by diluting pool normal plasma with factor deficient plasmas such that the final factor concentration ranged from 10 - 100 %. PT testing of these samples was performed on the MLA-1000C instrument.

% Factor	Prothrombin Time (secs)			
	Factor II	Factor V	Factor VII	Factor 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

Correlation: Correlation studies were performed against two other sensitive thromboplastin reagents by performing PT testing on normal and abnormal samples.

	PT Correlation	INR Correlation
Thromboplastin DS vs. Reagent A, (N=49)	R = 0.98 y = 1.16x + 1.30	R = 0.98 y = 0.89x + 0.05
Thromboplastin DS vs. Reagent B, (N=49)	R = 0.95 y = 1.01x + 2.20	R = 0.95 y = 0.82x + 0.10

REFERENCES

1. Errichetti A. M., Holden A., Ansell J.: Management of Oral Anticoagulant Therapy. Experience with an Anticoagulation Clinic. Arch Inter Med 144, 1966-68, 1984.
2. Hirsh 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.

3. 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
4. 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.
5. Young D.S., Thomas D.W., Friedman R.B. et al: Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests. Clin. Chem. 18: 1041, 1972.
6. Dalen J. E., Hirsh J.: American College of Chest Physicians and the National Heart, Lung, and Blood Institute National Conference on Antithrombotic Therapy. Arch. Inter. Med. 146, 462 – 472, 1966.
7. Palaereti G., Coccheri S., Poggi M. et al: Oral Anticoagulant Therapy Control; Evidence that the INR Expression Improves the interlaboratory Comparability of Results. The Bologna Oral Anticoagulant Control Exercise. Thromb Haemostasis 58:905-910, 1987.