

TEMPO DI PROTROMBINA secondo QUICK (PT)

REF CO1010 7x5 mL

PRINCIPIO DEL METODO

PT LYO 5 è una Tromboplastina estratta da cervello di coniglio, liofila da ricostituire con un proprio diluente fornito nel kit, per la determinazione del Tempo di Protrombina secondo Quick. Essa contiene il Fattore Tissutale, lipidi e ioni calcio ed è utilizzata per lo studio della via estrinseca della coagulazione. PT LYO 5 è una Tromboplastina altamente sensibile agli antagonisti della Vitamina K, ai bassi livelli dei fattori della via estrinseca (Fattore II, V, VII e X), ai disordini ereditari o acquisiti della coagulazione, alla insufficienza epatica.

Quando la Tromboplastina calcica PT LYO 5 viene aggiunta al plasma del paziente, si induce la formazione di un coagulo di fibrina in un tempo misurabile o manualmente o a mezzo strumentazione ottica e meccanica.

SIGNIFICATO CLINICO

Il Tempo di Protrombina o tempo di Quick (noto anche come PT) e le sue misure derivate (Ratio, INR e Attività Protrombinica Percentuale) sono misure della via estrinseca e comune della coagulazione. Esso viene utilizzato per determinare la tendenza alla coagulazione del sangue (screening pre operatorio), per adeguare il dosaggio della terapia anticoagulante con warfarin, oppure per meglio determinare la gravità di una epatopatia e verificare lo stato della vitamina K. Il PT è utile per valutare cinque dei dodici fattori della coagulazione (I - Fibrinogeno -, II - Protrombina, V - Proaccelerina, VII - Proconvertina e X - Protrombinasi). Tutti questi fattori sono sintetizzati dal fegato e tre di questi (II, VII e X) sono attivati da enzimi vitamina K-dipendenti. Gli anticoagulanti orali, come il Coumadin - Warfarin, sono degli antagonisti della vitamina K e come tali inibiscono l'attivazione dei sopraccitati fattori della coagulazione. Agendo in questo modo, questi farmaci "fluidificano il sangue", impedendo che si formino dei coaguli all'interno del torrente circolatorio. Il PT viene utilizzato in combinazione con la determinazione del Tempo di Tromboplastina Parziale Attivata (aPTT), che misura la via intrinseca della coagulazione.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagent: Tromboplastina tissutale estratta da cervello di coniglio.

Solvent: Tampone con ioni calcio e stabilizzanti.

PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Prima della preparazione del Reagente, se conservato a 2-8° C il kit è stabile fino alla data riportata sulla etichetta.

Ricostituire un flacone di Reagent liofilo con l'intero contenuto di 5 mL di un flacone di Solvent. Mantenere il Reagent così preparato alla temperatura di 18-25°C per almeno 30 minuti, agitando dolcemente di tanto in tanto, evitando scuotimenti energici e formazione di schiuma.

La stessa cosa deve essere fatta nei successivi utilizzi. Dopo ricostituzione, il Reagent è stabile 8 ore a 37° C, 1 giorno a 22° C, 5 giorni a 16° C, 12 giorni a 2-8°C. Non congelare. Per un uso in più sedute analitiche dello stesso flacone, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente il flacone e di riporlo in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione. Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come mancato recupero dei valori di plasmidi di controllo certificati.

CAMPIONI

Plasma fresco e decalcificato. Prelevare da vena 9 parti di sangue intero e miscelare con 1 parte di citrato trisodico (3,2% - 109 mmol/L). Non è raccomandato il citrato trisodico 3,8% - 129 mmol/L). Miscelare delicatamente, centrifugare (1500 x g per 15 minuti) prima di eseguire il test

(entro le 2 ore dal prelievo) sul plasma sovranatante. Per ulteriori dettagli sulla modalità di prelievo, riferirsi al documento NCCLS H3-A3 e H21-A3.

Per Uso Diagnostico In Vitro

PROCEDURA

Per utilizzo sui sistemi automatici, fare riferimento al manuale d'uso dello strumento utilizzato.

Per utilizzo sui sistemi manuali o semiautomatici, procedere come segue (è sempre consigliabile eseguire le determinazioni in duplicato).

1. Portare a 37° C un volume di Reagent (Tromboplastina Calcica ricostituita) sufficiente per l'esecuzione di test programmati.
2. Aggiungere ad ogni cuvetta di reazione 100 µL di plasma di controllo, plasma di calibrazione (intero o una sua diluizione) o plasma del paziente in esame.
3. Incubare le cuvette di reazione per almeno 2 minuti a 37° C.
4. Portare in cella di lettura una cuvetta di reazione per volta, azzerare il cronometro, aggiungere 200 µL di Reagent (Tromboplastina Calcica ricostituita) e contemporaneamente far partire il cronometro.
5. Misurare il tempo di coagulazione

RISULTATI

I risultati si possono esprimere in 4 modalità:

- 1) **Secondi:** il tempo di coagulazione osservato.
- 2) **Percentuale di Attività.**

A partire da un Plasma di Calibrazione

MTD PLASMA CAL 14x1 mL - REF CO1120

allestire una serie di diluizioni a raddoppio con soluzione fisiologica fino ad ottenere le diluizioni 1:2 - 1:4 - 1:8. In caso che il valore di attività del plasma sia certificato come 100%, si otterranno plasmidi diluiti con attività rispettivamente del 50%, 25%, 12,5%. Per valori differenti del calibratore, dividere il valore assegnato rispettivamente per 2, per 4 e per 8. Per esempio, se il calibratore vale il 96%, le diluizioni varranno 48%, 24%, 12%. Di ogni diluizione determinare il tempo di coagulazione eseguendo i test almeno in duplicato o, meglio, in triplicato. Costruire una Curva di Calibrazione riportando i Tempi (valore medio dei replicati) contro la percentuale di Attività (%) e su essa riportare i tempi dei campioni per ottenere la percentuale di Attività corrispondente. Se lo strumento adoperato lo consente, è possibile immettere i valori della curva di calibrazione ottenuta per una gestione automatica del calcolo dei campioni. E' possibile effettuare anche ulteriori o differenti diluizioni del calibratore, secondo necessità, ed ampliare o modificare i valori della curva che si sta allestendo.

3) **Ratio.** E' il rapporto tra il tempo ottenuto dal paziente in esame ed il tempo ottenuto dal Plasma di Calibrazione al 100%

4) **INR (International Normalized Ratio).** E' un indice di standardizzazione consigliato dalla WHO (World Health Organization). Esso tiene conto della sensibilità della Tromboplastina adoperata, sensibilità espressa con il valore di ISI (International Sensitivity Index) che a sua volta tiene conto sia del Reagente che dello strumento adoperato per la lettura. L'ISI rappresenta la sensibilità del sistema in uso (strumento + reagente) in rapporto ai fattori della coagulazione. Più l'ISI è bassa, più il sistema è sensibile. I valori di ISI del Reagente variano da lotto a lotto e sono riportati nel foglio allegato al kit. Essi sono differenti a seconda della tipologia di strumentazione.

Per calcolare l'INR, elevare la Ratio (base) all'ISI (esponente).

INR= Ratio^{ISI}

Per esempio, se il paziente ha un tempo di 36 secondi e se il plasma 100% ha un tempo di 12 secondi, allora:

$$\text{Ratio} = \text{Tempo Paziente} / \text{Tempo Plasma } 100\% = 36 / 12 = 3$$

Se l'ISI della Tromboplastina, per il sistema adoperato, è 1,05:

$$\text{INR} = \text{Ratio}^{\text{ISI}} = 3^{1,05} = 3,17$$

CONTROLLO DI QUALITA'

Per il Controllo di Qualità Interno (verifica della Precisione - Ripetibilità), adoperare Plasmi di Controllo a livello normale (I) e patologico (II):

MTD PLASMA CONT I-II 7+7 x 1 mL REF: CO1110

Per il Controllo di Qualità Esterno (VEQ) (verifica dell'Accuratezza), ogni laboratorio dovrebbe aderire ad un programma presso un Ente terzo certificato.

VALORI ATTESI

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati. I valori normali dipendono dalla popolazione dell'area in cui si opera e dalla strumentazione adoperata.

Solo come linea guida, si possono considerare normali:

- secondi: 11 – 14
- Attività %: 120% - 80%
- INR : fino a 1,6

I range terapeutici per l'INR, ai fini della terapia anticoagulante, variano da patologia a patologia e sono valutati clinicamente dai medici che seguono le terapie.

PRESTAZIONI**PRECISIONE:**

La precisione dipende da molti fattori quali lo strumento, la tecnica usata, il reagente. E' stato eseguito uno studio sulla precisione con una serie di 20 campioni normali e 20 patologici ed è stato valutato il CV% della serie:

Livello Normale: Campioni= 20; CV = 1,9%

Livello Patologico: Campioni= 20; CV = 2,3%

SENSIBILITA'

Lo studio della sensibilità è stato realizzato eseguendo diluizioni scalari di un plasma considerato normale (con attività intorno al 100% ed INR intorno a 1). Si sono ottenuti i seguenti risultati:

$$100\% = 12,6'' - 50\% = 18,5'' - 25\% = 34,8'' - 12,5\% = 43,6''$$

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE)

Il confronto tra questa Tromboplastina (x) ed un altro prodotto del commercio (y), ha dato i seguenti risultati su 20 campioni diversi:

- Correlazione tempi: $r=0,98$ $y=1,16x + 1,3$
- Correlazione INR: $r=0,98$ $y=0,89x + 0,05$

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

- Ossalato di sodio, EDTA ed Eparina non sono utilizzabili quali anticoagulanti.
- Trigliceridi > 700 mg/dL, Bilirubina > 15 mg/dL, Emoglobina > 0,68 g/dL possono interferire
- I tempi possono risultare allungati se il paziente fa uso di contraccettivi orali, di corticosteroidi, EDTA, asparaginasi, clofibrato, eritromicina, etanolo, tetraciclina ed anticoagulanti orali quali eparina e warfarin.
- I tempi possono risultare ridotti per di uso di antiistaminici, di caffeina, di fenobarbital e di Vitamina K.

NOTE

1. Questo metodo può essere utilizzato con diversi strumenti. Qualsiasi applicazione a uno strumento deve essere validata per dimostrare che i

risultati soddisfano le caratteristiche di prestazione del metodo. Si consiglia di validare periodicamente lo strumento. Contattare il proprio distributore per qualsiasi domanda sul metodo di applicazione.

2. La diagnosi clinica non dovrebbe essere fatta sui risultati di un singolo risultato del test, ma dovrebbe integrare sia i dati clinici che quelli di laboratorio

PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le sue concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il prodotto è etichettato secondo le direttive CE. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè si maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali, applicando la legislazione vigente.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA COMPLETA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Quick AJ: A study of the coagulation defect in haemophilia and in Jaundice. Am J Med Sci; 190:501; 1935.

WHO Expert Committee on Standardization: WHO Technical Report Series. No.889; 1999.

Van den Besselaar AMHP: The significance of the international normalized ratio for oral anticoagulant therapy. JIFCC; 3:146; 1991.

Poller L: Therapeutic ranges for oral anticoagulation in different thromboembolic disorders. Ann Haematol; 64:52; 1992.