

PHOSPHOLIN ES

Activated Partial Thromboplastin Time

English Version

INTENDED USE

Phospholin ES APTT reagent is an ellagic acid based reagent with soybean phospholipids, buffers, stabilizers and preservatives. Phospholin ES is intended for use as an activated partial thromboplastin time (APTT) reagent. The APTT test is a qualitative assay used in routine coagulation screening of patient plasma to detect deficiencies in the intrinsic pathway. It is also used to monitor heparin therapy and in the detection of Lupus Anticoagulants. Phospholin ES is to be used by qualified laboratory personnel.

SUMMARY AND PRINCIPLE

The activated partial thromboplastin time (APTT) is used to detect disorders in the intrinsic coagulation system, which involves coagulation factors II, V, VIII IX, XI, and XII. A modified version of the APTT is often used in assay systems that quantitate these factors. The APTT is commonly used for pre-surgical screening for intrinsic factor deficiencies (1), for monitoring heparin therapy (2), and in the detection of Lupus Anticoagulants (3).

In the basic screening test, the activated partial thromboplastin time indirectly measures the formation of thrombin by its action on fibrinogen resulting in a fibrin clot. In the test, citrated test plasma is mixed with APTT reagent for a specified period of time (typically 3 minutes) at 37°C followed by the addition of pre-warmed (37°C) calcium chloride (0.025 M). The clotting time is initiated by the addition of calcium chloride. The time (in seconds) required for clot formation is the activated partial thromboplastin time (APTT). Clot detection can be by mechanical, manual, or photo-optical measurement

REAGENTS

WARNING: FOR *IN-VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY
1. PHOSPHOLIN ES Reagent

Ingredients: The reagent contains 0.1mM ellagic acid with phospholipids derived from soybean lecithin. Buffers, stabilizers, and preservatives have been added.

Preparation for Use: The reagent is packaged ready for use. The vial should be inverted several times until a homogeneous suspension is obtained.

Storage and Stability: **PHOSPHOLIN ES** Reagent should be stored at 2 to 8°C when not in use and is stable until the date indicated on the vial.

DO NOT FREEZE.

Signs of Deterioration: The reagent is normally a homogeneous solution. A sediment may form upon standing that should dissipate easily upon mixing by inversion. Failure of normal plasma or controls to fall within established laboratory quality control ranges may indicate product deterioration.

2. Calcium Chloride Reagent

Ingredients: 0.025M Calcium Chloride

Preparation for Use: The reagent is packaged ready for use. **Storage and Stability:** 0.025M Calcium Chloride Reagent is stable until the date indicated on the vial.

Instruments

APTT times may be determined with **PHOSPHOLIN ES** using semi-automated and automated coagulation instruments.

Specimen Collection And Handling

NOTE: After initial whole blood collection, during testing all test tubes, syringes and pipettes should be plastic.

Specimen: Plasma obtained from whole blood anti-coagulated with 0.1 M sodium citrate. Use of hemolyzed, lipemic, or icteric samples should be avoided as these conditions may affect results, especially when using photo-optical instruments.

Specimen Collection: Nine parts of freshly collected whole blood should be immediately added to one part anticoagulant.

Specimen Preparation: Centrifuge the whole blood specimen at 2500 x g for 15 minutes (NCCLS H21-A2, 1991).

Immediately separate the plasma from the red blood cells using a plastic pipette and place it in a plastic test tube.

Perform the activated partial thromboplastin time assay within 2

hours.

Storage and Stability: Before and during testing the plasma sample should be maintained in the plastic test tubes at 2 to 8°C to insure further stability. If testing is delayed for more than 2 hours, plasma may be stored at -20°C or below for up to one month. Frozen samples should be thawed rapidly at 37°C before testing.

Materials Provided: Materials needed for **PHOSPHOLIN ES** assays are provided in the following packaging configurations. **PHOSPHOLIN ES**

Reagent 5 x 5 mL vials, Phospholin ES

Reagent 5 x 5 mL vials, 0.025M Calcium Chloride

Reagent 5 x 10 mL vials, Phospholin ES

Reagent 5 x 10 mL vials, 0.025M Calcium Chloride

Materials and Equipment Required but not Provided:

Coagulation Instrument or 37°C water bath and timer

Reaction Cups or plastic test tubes

Pipettes to deliver 1.0 and 0.1 mL

Centrifuge

Distilled or deionized water

Control Plasmas:

PlasmaCon N

PlasmaCon L-1

PlasmaCon L-2

Test Procedure for APTT

NOTE: Throughout testing all test tubes, syringes and pi-pettes should be plastic.

I. Automated and Semi-Automated Methods

If using an instrument to perform this test, refer to the appropriate instrument Operator's Manual for instructions.

II. Manual method

1. Collect blood specimen according to directions in SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING SECTION.

2. Centrifuge the anti-coagulated whole blood specimen at 2500 x g for 15 minutes or equivalent force-time.

3. While the blood specimen is centrifuging, reconstitute the control plasma according to the package insert included with each control.

4. Immediately after centrifugation, separate the plasma from the red blood cells and place in a plastic tube at 2 to 8°C until assayed. The maximum storage time at 2 to 8°C is 2 hours.

5. Place the 0.025 M Calcium Chloride Reagent into a test tube and pre-warm to 37°C (requires approximately 5 minutes).

6. Pipette 100 µL of the patient plasma or control plasma into a reaction tube.

7. Gently mix the **PHOSPHOLIN ES** Reagent by inversion to re-suspend any sediment.

8. Pipette 100 µL of **PHOSPHOLIN ES** Reagent into the reaction tube containing patient plasma or control plasma.

9. Incubate the **PHOSPHOLIN ES** Reagent and patient plasma at 37°C for 3-5 MINUTES.

10. Add 100 µL of pre-warmed 0.025 M Calcium Chloride, simultaneously starting a timer, and record the time (in seconds) required for clot formation.

11. The test results (clot time) are reported directly in seconds as the APTT Time.

Heparin Monitoring

When using the APTT test to monitor heparin therapy, it is important to construct an *in-vitro* reference curve that reflects the average heparin response, since individual patients respond differently to heparin. In general, the accepted therapeutic range for heparin is 0.3 to 0.7 units/mL. The following precautions should be considered when monitoring heparin therapy.

- Time of collection is important, since heparin has an *in-vivo* half-life of only 1.5 hours.
- A base line APTT on each patient should be established before therapy starts in order to determine the degree of the patient APTT response. This should be correlated to the heparin dose response curve established by the testing

laboratory.

3. Heparin dose response curves should be constructed using the same heparin employed in therapeutic use to eliminate variables connected with heparin preparations derived from different sources (e.g., porcine mucosa or bovine lung).

4. Heparin dose response curves must be reestablished with each new lot number of reagent.

Quality Control

Each laboratory should establish a quality control program that includes normal and abnormal controls to evaluate instrument, reagent and technologist performance. The normal and abnormal controls should be tested daily prior to performing tests on patient plasmas. Monthly quality control charts (Levi Jennings) are recommended to determine the mean and standard deviation of control plasma.

A normal control such as PlasmaCon N and abnormal level 1 and level 2 controls such as PlasmaCon L-1 and PlasmaCon L-2 are recommended. If the controls do not perform within their reference ranges, patient results should be considered invalid and not reported.

Results

Results of the activated partial thromboplastin time testing should be reported as the APTT in seconds. These results should be interpreted in relation to the normal range for APTT testing in each laboratory. Times that are shorter or longer than the normal range may be indicative of an abnormal condition in the patients coagulation system.

Limitations

Expected values for the APTT test will vary from one laboratory to another, depending on the technique used. The method of clot detection, temperature, pH, collection technique, type of anticoagulant and time and method of specimen storage are all very important. Thus, laboratories should establish their own expected reference values for patients and well-defined performance standards for the control plasmas. In addition close attention should be paid to the condition of the sample. Use of hemolyzed, lipemic, or icteric samples should be avoided as these conditions may affect results, especially when using photo-optical instruments.

EXPECTED VALUES

A reference range study was conducted using frozen plasma samples from 40 normal health adults. (approximately equal numbers of males and females were used). The APTT results were as follows:
PHOSPHOLIN ES (N= 40)

	Mean (seconds)	Range for +/- 2 SD
PHOTO-OPTICAL	29.8	23.2 – 36.4
MECHANICAL	31.8	27.1—36.5

These values should serve only as guidelines. Because differences may exist among instruments, laboratories and local populations, it is recommended that each laboratory establish its own reference range of expected APTT values.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

I. Precision Studies

Precision studies were performed to establish Within-Run and Between-Run CV’s for normal control plasma and abnormal control plasma. A single lot number of **Phospholin ES** kits was used for these studies. Results are shown below:

Within Run (APTT in seconds)

Control	N	Mean (secs.)	S.D.	C.V.
PlasmaCon N	30	29.3	0.2	0.9%
PlasmaCon L-2	30	88.2	0.6	0.6%

Between Run (APTT in seconds)

Control	N	Mean (secs.)	S.D.	C.V.
PlasmaCon N	15	30.6	0.68	2.24%
PlasmaCon L-2	15	91.4	2.61	2.85%

II. Comparison Studies

A. Patient Testing - Comparison of **PHOSPHOLIN ES** Reagent and a commercially available reagent was performed using samples with normal and abnormal clotting activities due to either heparin therapy, factor deficiencies, or both. A total of 140 samples, measured in triplicate, were tested.

Parameters of the linear regression equations were:

Photo-optical	slope = 0.864	r = 0. 92
Mechanical	slope = 1.0929	r = 0. 93

REFERENCES:

- Proctor R.R, Rapaport S.I., The Partial Thromboplastin Time with Kaolin. AM.J.Clin. Path. 36:212-219, 1961.
- Brandt J.T., Triplett D.A., Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments on the APTT. AM.J.Clin. Path. 76: 530-537, 1981.
- Kelsey P.R., The Diagnosis of Lupus Anticoagulants by the Partial Thromboplastin Time, Thromb. Haemost. 52: 172-175, 1984.

☪

Version Francaise

APPLICATION

Le réactif de test du TCA **Phospholin ES** est un réactif à base d'acide ellagique contenant des phospholipides de soja, des tampons, des stabilisateurs et des conservateurs. Phospholin ES est conçu pour être utilisé comme réactif lors des tests du temps de céphaline activée (TCA). Le test TCA est un dosage qualitatif utilisé en routine dans l'examen de la coagulation du plasma des patients pour détecter d'éventuelles déficiences de la voie intrinsèque. Il est également utilisé pour le suivi des traitements par héparine et pour la détection des anticoagulants circulants. Phospholin ES doit être utilisé par des personnels de laboratoire qualifiés.

RÉSUMÉ ET PRINCIPE

Le temps de céphaline activée (TCA) est utilisé pour détecter les troubles du système de coagulation intrinsèque, qui impliquent les facteurs de coagulation II, V, VIII IX, XI et XII. Une version modifiée du TCA est souvent employée dans les systèmes de dosage qui quantifient ces facteurs. Le TCA est couramment utilisé dans le dépistage préchirurgical des déficiences en facteurs intrinsèques (1), le suivi des traitements par héparine (2) et la détection des anticoagulants circulants (3). Dans le test de dépistage de base, le temps de céphaline activée mesure indirectement la formation de thrombine par son action sur le fibrinogène, qui entraîne la formation d'un caillot de fibrine. Dans ce test, le plasma citraté est mélangé à un réactif de test du TCA pendant une durée donnée (généralement 3 minutes) à 37 °C, puis du chlorure de calcium (0,025 M) préchauffé à 37 °C est ajouté. Le temps de coagulation est calculé à partir de l'ajout du chlorure de calcium. La durée (en secondes) nécessaire à la formation d'un caillot est appelée temps de céphaline activée (TCA). La détection d'un caillot peut être effectuée manuellement ou via un instrument mécanique ou photo-optique

RÉACTIFS

AVERTISSEMENT : POUR UTILISATION DIAGNOSTIQUE *IN VITRO* UNIQUEMENT

1. Réactif PHOSPHOLIN ES

Ingédients : Le réactif contient 0,1 mM d'acide ellagique et des phospholipides dérivés de la lécithine de soja. Des tampons, stabilisateurs et conservateurs ont été ajoutés.

Préparation avant utilisation : Ce réactif est livré prêt à l'emploi. Le flacon doit être retourné plusieurs fois afin d'obtenir une suspension homogène. **Conservation et stabilité :** **PHOSPHOLIN ES** doit être conservé entre 2 et 8 °C lorsqu'il n'est pas utilisé et demeure stable jusqu'à la date indiquée sur le flacon.

NE PAS CONGELER.

Signes de détérioration : Ce réactif est normalement une solution homogène. Un sédiment peut se former au repos mais doit se dissiper facilement lorsque le contenu est mélangé par retournement du flacon. Le fait que le plasma normal ou les contrôles se situent en dehors des plages de contrôle qualité établies par le laboratoire peut indiquer une détérioration du produit.

2. Réactif Chlorure de calcium

Ingédients : Chlorure de calcium à 0,025 M

Préparation avant utilisation : Ce réactif est livré prêt à l'emploi.

Conservation et stabilité : Chlorure de calcium à 0,025 M et demeure stable jusqu'à la date indiquée sur le flacon.

Instruments

Le TCA peut être déterminé en utilisant **PHOSPHOLIN ES** sur des instruments de coagulation automatisés ou semi-automatisés.

Prélèvement et manipulation des échantillons

REMARQUE: Après le prélèvement initial de sang total,

pendant le test, tous les tubes à essai, seringues et pipettes utilisés doivent être en plastique.

Échantillon: Plasma obtenu à partir de sang total anticoagulé avec 0,1 M de citrate de sodium. L'utilisation d'échantillons hémolysés, icteriques ou lipémiques doit être évitée car ces facteurs peuvent affecter les résultats, en particulier sur des instruments photo-optiques.

Prélèvement de l'échantillon: Ajouter le plus rapidement possible un volume d'anticoagulant à neuf volumes de sang total fraîchement prélevé.

Préparation de l'échantillon: Centrifuger l'échantillon de sang total à 2500 x g pendant 15 minutes (NCCLS H21-A2, 1991). Séparer immédiatement le plasma des globules rouges à l'aide d'une pipette en plastique et le déposer dans un tube à essai en plastique. Mesurer le TCA dans les 2 heures qui suivent.

Conservation et stabilité : Avant et pendant l'analyse, l'échantillon de plasma doit être conservé dans des tubes à essai en plastique entre 2 et 8 °C afin de garantir sa stabilité. Si le test est retardé de plus de 2 heures, le plasma peut être conservé à - 20 °C maximum pendant un mois au plus. Les échantillons congelés doivent être décongelés rapidement à 37 °C avant analyse.

Matériels fournis : Les matériels nécessaires pour les tests avec **PHOSPHOLIN ES** sont fournis et conditionnés comme suit :

PHOSPHOLIN ES

Réactif Phospholin ES en flacons de 5 ml (x 5)

Réactif Chlorure de calcium à 0,025 M en flacons de 5 ml (x 5)

Réactif Phospholin ES en flacons de 10 ml (x 5)

Réactif Chlorure de calcium à 0,025 M en flacons de 10 ml (x 5)

Matériels et équipements requis mais non fournis :

Instrument de coagulation ou bain-marie à 37 °C et minuteur

Cuvettes à réactif ou tubes à essai en plastique

Pipettes graduées à 1,0 et 0,1 ml

Centrifugeuse

Eau distillée ou déionisée

Plasmas de contrôle :

PlasmaCon N

PlasmaCon L-1

PlasmaCon L-2

Procédure de test pour le TCA

REMARQUE : Tout au long de l'analyse, tous les tubes à essai, seringues et pipettes doivent être en plastique.

I. Méthodes automatisée et semi-automatisée

En cas d'utilisation d'un instrument lors de ce test, se reporter au manuel de l'utilisateur de l'instrument pour plus d'instructions.

II. Méthode manuelle

1. Prélever un échantillon sanguin conformément aux instructions figurant dans la section PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS.

2. Centrifuger l'échantillon de sang total anticoagulé à 2500 x g pendant 15 minutes ou selon un rapport force/durée équivalent.

3. Pendant la centrifugation de l'échantillon sanguin, reconstituer le plasma de contrôle conformément à la notice fournie avec chaque contrôle.

4. Juste après la centrifugation, séparer le plasma des globules rouges et le déposer dans un tube en plastique qui sera conservé entre 2 et 8 °C jusqu'à ce qu'il soit analysé. La durée de conservation maximale entre 2 et 8 °C est de 2 heures.

5. Placer le chlorure de calcium à 0,025 M dans un tube à essai et préchauffer à 37 °C (cela prend environ 5 minutes).

6. Pipeter 100 µl de plasma de patient ou de plasma de contrôle dans un tube à essai.

7. Mélanger doucement le réactif **PHOSPHOLIN ES** en le retournant afin d'éliminer tout sédiment.

8. Pipeter 100 µl de réactif **PHOSPHOLIN ES** dans le tube à essai contenant du plasma de patient ou du plasma de contrôle.



R2 Diagnostics, Inc.
South Bend, Indiana USA (574) 288-4377



Enzyme Research Laboratories, Ltd.
Swansea, UK

PHOSPHOLIN ES

Activated Partial Thromboplastin Time

Deutsche Version

VERWENDUNGSZWECK

Das aPTT-Reagenz **Phospholin ES** ist ein Reagenz auf Ellagsäurebasis, das Phospholipide aus Sojabohnen, Puffer, Stabilisatoren und Konservierungsmittel enthält. Phospholin ES ist für die Verwendung als aktiviertes partielles Thromboplastinzeit (aPTT)-Reagenz bestimmt. Der aPTT-Test ist ein qualitatives Assay, das für routinemäßige Screeningtests von Patientenplasma auf Gerinnungsstörungen zur Feststellung von Defekten des intrinsischen Systems verwendet wird. Es wird auch zur Überwachung der Heparintherapie und zum Nachweis von Lupus-Antikoagulanzen verwendet. Phospholin ES darf nur von geschultem Laborpersonal verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND WIRKPRINZIP

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wird zum Nachweis von Störungen des intrinsischen Gerinnungssystems mit Defekten der Gerinnungsfaktoren II, V, VIII IX, XI und XII verwendet. Oft wird eine veränderte Version der aPTT bei Assaysystemen verwendet, mit denen diese Faktoren quantitiert werden. Die aPTT wird für gewöhnlich beim der präoperativen Screening auf intrinsische Defekte eines Faktors (1), zur Überwachung der Heparintherapie (2) und beim Nachweis von Lupus-Antikoagulanzen (3) verwendet. Beim Basis-Screeningtest wird mittels der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit indirekt die Bildung von Thrombin gemessen, und zwar durch dessen Wirkung auf das Fibrinogen, die zur Fibringerinnung führt. In dem Test wird Citrat-Testplasma eine bestimmte Zeit lang (normalerweise 3 Minuten) bei einer Temperatur von 37 °C mit aPTT-Reagenz gemischt. Anschließend wird vorgewärmtes (37 °C) Kalziumchlorid (0,025 M) hinzugefügt. Die Gerinnungszeit beginnt mit dem Hinzufügen von Kalziumchlorid. Die für die Bildung eines Gerinnsels benötigte Zeit (in Sekunden) ist die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT). Die Gerinnungsdetektion kann durch mechanische, manuelle oder photooptische Messung erfolgen.

REAGENZIEN

WARNUNG: NUR FÜR DIE *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK
1. PHOSPHOLIN ES Reagenz
Zusammensetzung: Das Reagenz enthält 0,1 mM Ellagsäure mit Phospholipiden aus Sojabohnenlecithin. Zusätzlich enthält es Puffer, Stabilisatoren und Konservierungsmittel.
Vorbereitung zum Gebrauch: Das Reagenz ist gebrauchsfertig verpackt. Die Flaschchen sollten mehrmals umgedreht werden, um eine homogene Suspension zu erhalten.
Lagerung und Stabilität: Das **PHOSPHOLIN ES** Reagenz sollte bei Nichtgebrauch bei 2 bis 8 °C gelagert werden, und ist bis zu dem auf dem Flaschchen angegebenen Datum stabil.
NICHT EINFRIEREN.
Anzeichen für Zersetzung: Das Reagenz ist normalerweise eine homogene Lösung. Im Ruhezustand kann sich ein Bodensatz bilden, der sich beim Vermischen durch mehrmaliges Umdrehen leich auflösen sollte. Wenn normales Plasma oder Kontrollen sich nicht innerhalb des zur Qualitätskontrolle im Labor festgelegten Bereiches befinden, kann das ein Anzeichen für die Zersetzung des Produkts sein.
2. 0,025 M Kalziumchlorid Reagenz
Zusammensetzung: 0,025 M Kalziumchlorid
Vorbereitung zum Gebrauch: Das Reagenz ist gebrauchsfertig verpackt.
Lagerung und Stabilität: Das 0,025 M Kalziumchlorid ist bis zu dem auf dem Flaschchen angegebenen Datum stabil.

Geräte
Zur Bestimmung der aPTT-Zeiten mit **PHOSPHOLIN ES** können halbautomatische und automatische Gerinnungsgeräte verwendet werden.

9. Mettre le réactif **PHOSPHOLIN ES** et le plasma de patient à incuber à 37 °C pendant 3 à 5 minutes.

10. Ajouter 100 µl de chlorure de calcium à 0,025 M préchauffé et lancer simultanément un minuteur. Noter la durée (en secondes) nécessaire à la formation d’un caillot.

11. Les résultats du test (temps de coagulation) sont indiqués directement en secondes et correspondent au TCA.

Suivi d'un traitement par héparine

Lorsque le TCA est utilisé pour surveiller un traitement par héparine, il est important d’élaborer une courbe de référence *in vitro* qui reflète la réponse moyenne à l’héparine car chaque patient répond différemment au traitement par héparine. En général, la plage thérapeutique acceptée pour l’héparine est de 0,3 à 0,7 unités/ml. Les précautions suivantes doivent être prises lors de la surveillance d’un traitement par héparine.

- Le moment du prélèvement a son importance car l’héparine a une demi-vie *in vivo* de seulement 1 heure et demie.
- Un TCA de référence doit être établi pour chaque patient avant le début du traitement afin de déterminer le degré de réponse au niveau du TCA du patient. Celui-ci doit être corrélé à la courbe de réponse à la dose d’héparine établie par le laboratoire d’analyse.
- Les courbes de réponse à la dose d’héparine doivent être élaborées avec la même héparine que celle employée lors du traitement afin d’éliminer les variables associées aux préparations d’héparine dérivées de diverses sources (ex. : muqueuse porcine ou poumon de bovin).
- Des courbes de réponse à la dose d’héparine doivent être établies pour chaque nouveau numéro de lot de réactif.

Contrôle qualité

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité incluant des contrôles normaux et anormaux afin d’évaluer les performances de l’instrument, du réactif et du technicien. Les contrôles normaux et anormaux doivent être testés tous les jours, avant de réaliser les tests sur le plasma des patients. Il est recommandé de générer des diagrammes de contrôle qualité mensuels (Levi Jennings) afin de déterminer la moyenne et l’écart-type du plasma de contrôle. Un contrôle normal tel que PlasmaCon N et des contrôles anormaux de niveau 1 et 2 tels que PlasmaCon L-1 et PlasmaCon L-2 sont conseillés. Si les performances des contrôles ne se situent pas dans les plages de référence, les résultats des patients doivent être considérés comme non valides et ne doivent pas être enregistrés.

Résultats

Les résultats du test du temps de céphaline activée doivent être indiqués en secondes. Ces résultats doivent être interprétés par rapport à la plage normale du test du TCA dans chaque laboratoire. Des temps inférieurs ou supérieurs à la plage normale peuvent indiquer une anomalie de la coagulation chez les patients.

Limits

Les valeurs attendues pour le test du TCA varient d'un laboratoire à l'autre en fonction de la technique utilisée. La méthode de détection des caillots, la température, le pH, la technique de prélèvement, le type d'anticoagulant, ainsi que la durée et la méthode de conservation de l'échantillon sont très importants. Ainsi, les laboratoires doivent établir leurs propres valeurs de référence attendues pour leurs patients et des standards de performance bien définis pour les plasmas de contrôle. De plus, il convient de faire particulièrement attention à l'état de l'échantillon. L'utilisation d'échantillons hémolysés, icériques ou lipémiques doit être évitée car ces facteurs peuvent affecter les résultats, en particulier sur des instruments photo-optiques.

VALEURS ATTENDUES

Une étude portant sur les plages de référence a été menée sur des échantillons de plasma congelé prélevés chez 40 adultes

sains. Le nombre de femmes et d’hommes était pratiquement égal. Les résultats du TCA étaient les suivants :
PHOSPHOLIN ES (N= 40)

	Moyenne (secondes)	Plage pour +/- 2 ET	
PHOTO-OPTIQUE	29,8	23,2 – 36,4	
MÉCANIQUE	31,8	27,1—36,5	

Ces valeurs ne doivent être utilisées qu’à titre de référence. En raison des différences qui peuvent exister entre les instruments, les laboratoires et les populations locales, il est recommandé à chaque laboratoire d’établir sa propre plage de référence des valeurs de TCA attendues.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

I. Études de précision

Des études de précision ont été réalisées pour déterminer les VC intracycle et inter-cycles pour les plasmas de contrôle normaux et anormaux. Un numéro de lot unique de **Phospholin ES** a été utilisé pour ces études. Les résultats sont indiqués ci-dessous :

Intracycle (TCA en secondes)

Contrôle	N	Moyenne (s)	ET	VC
PlasmaCon N	30	29,3	0,2	0,9 %
PlasmaCon L-2	30	88,2	0,6	0,6 %

Inter-cycles (TCA en secondes)

Contrôle	N	Moyenne (s)	ET	VC
PlasmaCon N	15	30,6	0,68	2,24 %
PlasmaCon L-2	15	91,4	2,61	2,85 %

II. Études de comparaison

A. Test des échantillons de patient - Le réactif **PHOSPHOLIN ES** et un réactif disponible dans le commerce ont été comparés sur des échantillons présentant une coagulation normale et anormale (en raison d'un traitement par héparine, de déficiences en facteurs de coagulation, ou des deux). Au total, 140 échantillons ont été testés en triple.

Les paramètres des équations de régression linéaire étaient :

Photo-optique	pente = 0,864	r = 0,92
Mécanique	pente = 1,0929	r = 0,93

RÉFÉRENCES :

- Proctor R.R, Rapaport S.I., The Partial Thromboplastin Time with Kaolin, AM.J.Clin. Path. 36:212-219, 1961.
- Brandt J.T., Triplett D.A., Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments on the APTT. AM.J.Clin. Path. 76: 530-537, 1981.
- Kelsey P.R., The Diagnosis of Lupus Anticoagulants by the Partial Thromboplastin Time, Thromb. Haemost. 52: 172-175, 1984.

CE

Probenentnahme und Handhabung

HINWEIS: Nach der Vollblutentnahme zu Beginn sollten

während der Untersuchungen sämtliche Teströhrchen, Spritzen und Pipetten aus Plastik bestehen.

Probe: Aus Vollblut gewonnenes Plasma, das mit 0,1 M Natriumcitrat antikoaguliert wurde. Die Verwendung von hämolytierten, lipämischen und ikterischen Proben sollte besonders bei der Verwendung photooptischer Geräte vermieden werden, da diese Eigenschaften die Ergebnisse beeinträchtigen können.

Probenentnahme: Neun Teile frisch entnommenes Vollblut sollten sofort mit einem Teil Antikoagulans versetzt werden.
Probenvorbereitung: Vollblutprobe bei 2500 x g für 15 Minuten (CLSI/NCCLS H21-A2, 1991) zentrifugieren. Mithilfe einer Plastikpipette Plasma sofort von den roten Blutzellen trennen und in ein Plastikteströhrchen füllen. Innerhalb von 2 Stunden das aktivierte partielle Thromboplastinzeit-Assay durchführen.
Lagerung und Stabilität: Um zu gewährleisten, dass die Plasmaprobe stabil bleibt, sollte diese vor und während der Untersuchungen bei einer Temperatur von 2 bis 8 °C in den Plastikteströhrchen aufbewahrt werden. Sollte sich die Testdurchführung um mehr als 2 Stunden verzögern, kann das Plasma bei einer Temperatur von oder unter -20 °C bis zu einem Monat lang aufbewahrt werden. Tiefgefrorene Proben sind vor dem Testen schnell bei einer Temperatur von 37 °C aufzutauen.

Im Packungsumfang enthaltene Materialien: Die zur Durchführung von **PHOSPHOLIN ES**-Assays erforderlichen Materialien sind in folgenden Verpackungsgößen erhältlich:
PHOSPHOLIN ES

- Reagenz 5 x 5 mL Flaschchen, Phospholin ES
- Reagenz 5 x 5 mL Flaschchen, 0,025 M Kalziumchlorid
- Reagenz 5 x 10 mL Flaschchen, Phospholin ES
- Reagenz 5 x 10 mL Flaschchen, 0,025 M Kalziumchlorid

Benötigte Materialien und Geräte, die nicht im Lieferumfang enthalten sind:
Gerinnungsgerät oder Wasserbad (37 °C) und Stoppuhr
Reagenzgefäße oder Plastikteströhrchen
Pipetten für 1,0 und 0,1 mL
Zentrifuge
Destilliertes oder entionisiertes Wasser
Kontrollplasma:

- PlasmaCon N
- PlasmaCon L-1
- PlasmaCon L-2

Testverfahren für aPTT

HINWEIS: Sämtliche beim Testen verwendete Teströhrchen, Spritzen und Pipetten sollten aus Plastik bestehen.

I. Automatische und halbautomatische Methoden
Wenn zur Durchführung dieses Tests ein Gerät verwendet wird, entnehmen Sie die Bedienungshinweise der entsprechenden Bedienungsanleitung für das Gerät.

II. Manuelle Methode

- Blutprobe entsprechend der Anleitung im ABSCHNITT PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG entnehmen.
- Antikoagulierte Vollblutprobe bei 2500 x g für 15 Minuten oder die entsprechende Zeit bei einer anderen Drehzahl zentrifugieren.
- Während der Zentrifugation der Blutprobe das Kontrollplasma entsprechend der Anleitung auf der Packungsbeilage, die jeder Kontrolle beiliegt, rekonstituieren.
- Plasma unmittelbar nach der Zentrifugation von den roten Blut zellen trennen, in ein Plastikröhrchen füllen und bis zum Test bei 2 bis 8 °C lagern. Die maximale Lagerzeit beträgt bei 2 bis 8 °C 2 Stunden.
- Das 0,025 M Kalziumchlorid-Reagenz in ein Teströhrchen geben und auf 37 °C vorwärmen (Vorwärmzeit etwa 5 Minuten).

CE

- 100 µL Patientenplasma oder Kontrollplasma in ein Reagenzglas pipettieren.
- Das **PHOSPHOLIN ES** Reagenz durch mehrmaliges Umdrehen vorsichtig mischen, damit entstandener Bodensatz resuspendiert wird.
- 100 µL **PHOSPHOLIN ES** Reagenz in das Reagenzglas mit dem Patientenplasma oder dem Kontrollplasma pipettieren.
- Das **PHOSPHOLIN ES** Reagenz und das Patientenplasma bei 37 °C für 3 - 5 MINUTEN inkubieren.
- 100 µL vorgewärmtes 0,025 M Kalziumchlorid hinzufügen und gleichzeitig die Stoppuhr starten, um die für die Gerinsselbildung benötigte Zeit (in Sekunden) zu messen.
- Die Testergebnisse (Gerinnungszeit) werden direkt in Sekunden als aPTT-Zeit berichtet.

Heparin-Überwachung

Bei der Verwendung des aPTT-Tests zur Überwachung einer Heparintherapie ist es erforderlich, aufgrund der unterschiedlichen Reaktion der einzelnen Patienten auf Heparin eine *in-vitro*-Bezugskurve mit der durchschnittlichen Heparin-Response zu erstellen. Der übliche therapeutische Bereich liegt für Heparin im Allgemeinen bei 0,3 bis 0,7 IE/mL. Bei der Überwachung einer Heparintherapie sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- Die Zeit der Probenentnahme ist ausschlaggebend, denn Heparin hat *in-vivo* eine Halbwertszeit von nur 1,5 Stunden.
- Vor Beginn der Therapie sollte der aPTT-Basiswert des Patienten bestimmt werden, um die patientenspezifische aPTT-Reaktion zu ermitteln. Dieser Wert wird auf der vom Untersuchungslabor aufgestellten Kurve für die Heparindosis-Response zugeordnet.
- Bei der Erstellung der Kurven für die Heparindosis-Response ist dasselbe Heparin zu verwenden wie bei der Therapie, um abweichende Eigenschaften im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Ausgangsmaterial der Heparinpräparate (z.B. Mukosa vom Schwein oder Rinderlunge) auszuschließen.
- Bei jeder neuen Losnummer des Reagenz muss die Kurve für die Heparindosis-Response neu bestimmt werden.

Qualitätskontrolle

Jedes Labor sollte ein Verfahren zur Qualitätskontrolle entwickeln, das normale und pathologische Kontrollen zur Evaluierung der Leistung des Geräts, des Reagenz und der Arbeitsweise des Untersuchers einschließt. Die normalen und pathologischen Kontrollen sollten täglich vor der Durchführung der Tests mit Patientenplasma getestet werden. Zur Bestimmung der durchschnittlichen und der Standardabweichung des Kontrollplasmas wird empfohlen, monatliche QK-Diagramme (nach Levey-Jennings) anzufertigen.

Es wird empfohlen, normale Kontrollen wie zum Beispiel PlasmaCon N und pathologische Level 1 und Level 2 Kontrollen wie zum Beispiel PlasmaCon L-1 und PlasmaCon L-2 durchzuführen. Wenn die Kontrollen nicht innerhalb der Referenzbereiche liegen, sind die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig anzusehen und dürfen nicht berichtet werden.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit-Tests sind als aPTT in Sekunden zu berichten. Die betreffenden Ergebnisse sollten in Beziehung zum laboreigenen Normalbereich für aPTT-Bestimmungen interpretiert werden. Zeiten, die unter- oder oberhalb des normalen Bereiches liegen, können auf eine Störung im Gerinnungssystem des Patienten hindeuten.

Grenzen des Verfahrens

Die beim aPTT-Test zu erwartenden Werte sind in Abhängigkeit von der angewendeten Methode von Labor zu Labor unterschiedlich. Überaus wichtig sind dabei die

verwendete Methode zur Gerinnungsdetektion, Temperatur, pH-Wert, Verfahren der Probenentnahme, Art des Antikoagulans sowie Dauer und Art der Probenlagerung. Daher sollte jedes Labor seine eigenen zu erwartenden Bezugswerte für Patientenplasma und klar definierte Leistungsstandards für die Kontrollplasmen festlegen. Größte Aufmerksamkeit sollte darüber hinaus den Bedingungen der Probe gewidmet werden. Die Verwendung von hämolytierten, lipämischen und ikterischen Proben sollte besonders bei der Verwendung photooptischer Geräte vermieden werden, da diese Eigenschaften die Ergebnisse beeinträchtigen können.

ZU ERWARTENDE WERTE

Eine Studie zum Referenzbereich wurde unter Verwendung tiefgefrorener Plasmaproben von 40 gesunden Erwachsenen durchgeführt. (Es wurde ungefähr die gleiche Anzahl von Männern und Frauen in die Studie aufgenommen.) Die Ergebnisse der aPTT-Tests waren wie folgt:
PHOSPHOLIN ES (N= 40)

	Mittelwert (Sekunden)	Bereich für +/- 2 SD	
PHOTOOPTISCH	29,8	23,2 – 36,4	
MECHANISCH	31,8	27,1—36,5	

Diese Werte dienen nur als Richtlinie. Da zwischen den Geräten, Labors und der örtlichen Bevölkerung Unterschiede vorhanden sein können, sollte jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich zu erwartender Ergebnisse bezüglich der aPTT-Werte festlegen.

LEISTUNGSMERKMALE

I. Präzisionsstudien

Es wurden Präzisionsstudien zur Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Varianzkoeffizienten für normales und pathologisches Kontrollplasma durchgeführt. Für diese Studien wurde eine einzige Losnummer des **Phospholin ES**-Kits verwendet. Die Ergebnisse sind unten dargestellt:

Intra-Assay (aPTT in Sekunden)					
Kontrolle	N	Mittelwert (Sekunden)	S.D.	VK	
PlasmaCon N	30	29,3	0,2	0,9 %	
PlasmaCon L-2	30	88,2	0,6	0,6 %	

Inter-Assay (aPTT in Sekunden)					
Kontrolle	N	Mittelwert (Sekunden)	S.D.	VK	
PlasmaCon N	15	30,6	0,68	2,24 %	
PlasmaCon L-2	15	91,4	2,61	2,85 %	

II. Vergleichsstudien

A. Patiententests - Es wurde ein Vergleich des**PHOSPHOLIN ES** Reagenz mit einem handelsüblichen Reagenz vorgenommen. Dabei wurden Proben mit normalem und mit pathologischem Gerinnungsverhalten aufgrund einer Heparintherapie, eines Faktormangels oder beider durchgeführt. Insgesamt wurden 140 Proben (bei dreifacher Messung) untersucht.

Die Parameter für die linearen Regressionsgleichungen lauteten:

Photooptisch	Neigung = 0,864	r = 0, 92
Mechanisch	Neigung = 1,0929	r = 0, 93

LITERATURHINWEISE:

- Proctor R.R, Rapaport S.I., The Partial Thromboplastin Time with Kaolin, AM.J.Clin. Path. 36:212-219, 1961.
- Brandt J.T., Triplett D.A., Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments on the APTT. AM.J.Clin. Path. 76: 530-537, 1981.
- Kelsey P.R., The Diagnosis of Lupus Anticoagulants by the Partial Thromboplastin Time, Thromb. Haemost. 52: 172-175, 1984.



R2 Diagnostics, Inc.
South Bend, Indiana USA (574) 288-4377

Enzyme Research Laboratories, Ltd.
Swansea, UK



LL-4501 Rev. C

PHOSPHOLIN ES

Activated Partial Thromboplastin Time

VALORI ATTESI

È stato condotto uno studio dei range di riferimento con l'utilizzo di campioni di plasma congelato prelevati da 40 soggetti adulti sani normali. (soggetti maschi e femmine sono stati reclutati in numero approssimativamente uguale). I risultati dell'APTT sono stati i seguenti:
PHOSPHOLIN ES (N= 40)

	Tempo medio (secondi)	Range per +/- 2 SD	
RILEVAZIONE FOTO-OTTICA	29,8	23,2 – 36,4	
RILEVAZIONE MECCANICA	31,8	27,1—36,5	

Questi valori sono da intendersi unicamente come linee guida. Dato che possono esserci delle differenze tra gli strumenti, i laboratori e le popolazioni locali, è consigliato che ogni -laboratorio fissi il proprio range di riferimento per i valori di APTT attesi.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

I. Studi di precisione

Sono stati condotti degli studi di precisione per stabilire i coefficienti di variazione (CV) intrasaggio ed intersaggio per il plasma di controllo normale ed il plasma di controllo anormale. Per questi studi è stato utilizzato un unico numero di lotto **Phospholin ES**. I risultati sono riportati qui di seguito.

Intersaggio (APTT in secondi)					
Controllo	N	Tempo medio (secondi)	S.D.	C.V.	
PlasmaCon N	30	29,3	0,2	0,9%	
PlasmaCon L-2	30	88,2	0,6	0,6%	

Intersaggio (APTT in secondi)					
Controllo	N	Tempo medio (secondi)	S.D.	C.V.	
PlasmaCon N	15	30,6	0,68	2,24%	
PlasmaCon L-2	15	91,4	2,61	2,85 %	

II. Studi comparativi

A. Verifica sul paziente – È stato effettuato un paragone di **PHOSPHOLIN ES** Reagente e di un reagente presente in commercio utilizzando campioni ad attività coagulante normale e anormale a causa della terapia con eparina, di carenze di -fattori o di entrambe. In totale sono stati sottoposti a test 140 campioni, con triplice misurazione.

I parametri delle equazioni di regressione lineare sono stati:					
Rilevazione foto-ottica	pendenza = 0,864	r = 0,92			
Rilevazione meccanica	pendenza = 1,0929	r = 0,93			

BIBLIOGRAFIA:

- Proctor R.R, Rapaport S.L, The Partial Thromboplastin Time with Kaolin. AM.J.Clin. Path. 36:212-219, 1961.
- Brandt J.T., Triplett D.A., Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments on the APTT. AM.J.Clin. Path. 76: 530-537, 1981.
- Kelsey P.R., The Diagnosis of Lupus Anticoagulants by the Partial Thromboplastin Time, Thromb. Haemost. 52: 172-175, 1984.

9. Incubare il **PHOSPHOLIN ES** Reagente ed il plasma del paziente a 37°C per 3-5 MINUTI.

10. Aggiungere 100 µL di cloruro di calcio 0,025 M preriscaldato, azionando contemporaneamente un cronografo e registrare il tempo (in secondi) necessario per la formazione di coaguli.

11. I risultati del test (tempo di coagulazione) vengono riportati direttamente in secondi nel Tempo APTT.

Monitoraggio dell'eparina

Quando si utilizza il test APTT per monitorare la terapia con eparina, è importante costruire una curva di riferimento *in-vitro* che rifletta la risposta media dell'eparina, dal momento che i singoli pazienti rispondono all'eparina in maniera diversa. In generale, la gamma terapeutica accettata per l'eparina è quella da 0,3 a 0,7 unità/mL. Occorre prendere in considerazione le seguenti precauzioni durante il monitoraggio della terapia con eparina.

- Il tempo di raccolta è importante, dato che l'eparina ha un'emivita *in-vivo* di appena 1,5 ore.
- Occorre determinare una linea basale APTT per ogni paziente prima che abbia inizio la terapia, al fine di determinare il grado della risposta APTT del paziente. Questo deve essere correlato alla curva di risposta alla dose di eparina stabilita dal laboratorio in cui viene effettuato il test.
- Le curve di risposta alla dose di eparina devono essere costruite utilizzando la stessa eparina utilizzata per l'uso terapeutico, al fine di eliminare le variabili connesse alle preparazioni con eparina derivate da varie fonti (per esempio, la mucosa suina o il polmone bovino).
- Le curve di risposta alla dose di eparina devono essere nuovamente determinate con ogni nuovo numero di lotto di reagente.

Controllo qualità

Ogni laboratorio deve stabilire un programma di controllo qualità comprendente controlli di routine e non di routine per valutare le prestazioni degli strumenti, dei reattivi e dei tecnici. I controlli di routine e non di routine devono essere effettuati giornalmente, prima di effettuare i test sul plasma dei pazienti. Si consigliano grafici di controllo della qualità con cadenza mensile (Levi Jennings) al fine di determinare la deviazione media e standard del plasma di controllo.

Si consigliano un controllo normale come PlasmaCon N e dei controlli anormali di livello 1 e livello 2 come PlasmaCon L-1 e PlasmaCon L-2. Se i controlli non danno risultati all'interno dei loro range di riferimento, i risultati del paziente non devono essere considerati validi e non devono essere riportati.

Risultati

I risultati dei test del tempo di trombolastina parziale attivata devono essere segnalati come APTT in secondi. Questi risultati devono essere interpretati in relazione al range normale per i test dell'APTT in ogni laboratorio. Tempi più brevi o più lunghi del normale range possono essere indicativi di una condizione anormale nel sistema di coagulazione dei pazienti.

Limitazioni

I valori previsti per il test APTT varieranno da un laboratorio all'altro, a seconda della tecnica utilizzata. Il metodo del rilevamento del coagulo, la temperatura, il pH, la tecnica di campionamento, il tipo di anticoagulante ed il tempo e metodo di conservazione del campione sono tutti elementi di grande importanza. Pertanto, è opportuno che i laboratori fissino i propri valori di riferimento previsti per i pazienti e degli standard di prestazioni ben definiti per i plasmi di controllo. Inoltre, occorre prestare grande attenzione alla condizione del campione. L'utilizzo di campioni emolizzati, lipemici o iterici deve essere evitato, dato che queste condizioni possono influenzare i risultati, specie nel caso vengano impiegati strumenti foto-ottici.

Campione: Plasma ottenuto da sangue intero anticoagulato con 0,1 M di citrato di sodio. L'utilizzo di campioni emolizzati, lipemici o iterici deve essere evitato, dato che queste condizioni possono influenzare i risultati, specie nel caso vengano impiegati strumenti foto-ottici.

Raccolta dei campioni: Nove parti di sangue intero appena prelevato devono essere aggiunte immediatamente ad una parte di anticoagulante.

Preparazione del campione: Centrifugare il campione di sangue intero a 2500 x g per 15 minuti (NCCLS H21-A2, 1991). Separare immediatamente il plasma dai globuli rossi utilizzando una pipetta di plastica e trasferirlo in una provetta di plastica. Effettuare il saggio del tempo di trombolastina parziale attivata entro 2 ore.

Conservazione e stabilità: Prima e durante i test occorre mantenere il campione di plasma nelle provette di plastica ad una temperatura tra i 2 e gli 8°C per garantire un'ulteriore stabilità. Se il test viene ritardato di più di 2 ore, è possibile conservare il plasma a una temperatura di -20°C o anche inferiore per un massimo di un mese. Prima del test, i campioni congelati devono essere scongelati rapidamente a 37°C.

Materiali forniti: I materiali necessari per i saggi di **PHOSPHOLIN ES** vengono forniti nelle seguenti configurazioni di confezionamento.

PHOSPHOLIN ES

Reagente 5 fiale da 5 mL, Phospholin ES
Reagente 5 fiale da 5 mL, 0,025M di cloruro di calcio
Reagente 5 fiale da 10 mL, Phospholin ES
Reagente 5 fiale da 10 mL, 0,025M di cloruro di calcio

Materiali e strumenti necessari, ma non in dotazione:

Strumento per la coagulazione, o bagnomaria a 37°C e cronografo

Recipienti di reazione o provette di plastica

Pipette per erogare 1,0 e 0,1 mL

Centrifuga

Acqua distillata o deionizzata

Plasmi di controllo:

- PlasmaCon N
- PlasmaCon L-1
- PlasmaCon L-2

ATTENZIONE: ESCLUSIVAMENTE PER USO DIAGNOSTICO IN -VITRO

1. Reagente PHOSPHOLIN ES

Ingredienti: Il reagente contiene 0,1mM di acido ellagico con fosfolipidi derivati dalla lecitina di soia. Sono stati aggiunti tamponi, stabilizzatori e conservanti.

Preparazione per l'uso: Il reagente è confezionato pronto per l'uso. La fiala deve essere capovolta più volte, fino ad ottenere una sospensione omogenea.

Conservazione e stabilità: Il reagente **PHOSPHOLIN ES** deve essere conservato ad una temperatura tra i 2 e gli 8°C quando non viene utilizzato ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla fiala.

NON METTERE NEL CONGELATORE.

Segni di deterioramento: Normalmente il reagente è una soluzione omogenea. È possibile che si formi un sedimento che dovrebbe dissolversi facilmente miscelando per capovolgimento. Qualora il plasma o i controlli normali non rientrino nei limiti dei controlli di qualità di laboratorio definiti, è possibile che ciò sia un segno di deterioramento del prodotto.

2. Reagente di cloruro di calcio

Ingredienti: 0,025M di cloruro di calcio

Preparazione per l'uso: Il reagente è confezionato pronto per l'uso.

Conservazione e stabilità: Il reagente 0,025M di cloruro di calcio ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla fiala.

Strumenti

È possibile determinare il tempio APTT con **PHOSPHOLIN ES** utilizzando strumenti di coagulazione semiautomatizzati ed automatizzati.

Prelievo e gestione dei campioni

NOTA: Dopo la raccolta iniziale di sangue intero, durante la verifica tutte le provette, le siringhe e le pipette devono essere di plastica.

Versione Italiana

USO PREVISTO

Il reagente APTT **Phospholin ES** è un reagente su base di acido ellagico con fosfolipidi di soia, tamponi, stabilizzatori e conservanti. L'uso previsto di Phospholin ES è di reagente del tempo di trombolastina parziale attivata (APTT). Il test APTT è un saggio qualitativo che si utilizza nello screening di routine della coagulazione del plasma dei pazienti per rilevare carenze nel percorso intrinseco. Si utilizza inoltre per monitorare la terapia con eparina e per rilevare gli anticoagulanti del lupus. Phospholin ES deve essere utilizzato da personale di laboratorio qualificato.

RIASSUNTO E PRINCIPIO

Il tempo di trombolastina parziale attivata (APTT) viene usato per rilevare disturbi nel sistema di coagulazione intrinseco, che comprende i fattori di coagulazione II, V, VIII, IX, XI e XII. Nei sistemi di saggio che quantificano questi fattori si usa spesso una versione modificata dell'APTT. L'APTT trova comunemente applicazione nello screening prechirurgico sulle carenze di fattore intrinseco (1), per monitorare la terapia con eparina (2) e per rilevare gli anticoagulanti del Lupus (3). Nel test di screening di base, il tempo di trombolplastina parziale attivata misura indirettamente la formazione di trombina mediante la sua azione sul fibrinogeno, provocando un coagulo di fibrina. Nel test, si miscelano plasma in esame citrato e reagente APTT per un periodo di tempo specificato (normalmente 3 minuti) a 37°C, cui fa seguito l'aggiunta di cloruro di -calcio preriscaldato (37°C) (0,025 M). Il tempo di coagulo viene avviato dall'aggiunta di cloruro di calcio. Il tempo (in secondi) necessario per la formazione del coagulo è il tempo di trombolplastina parziale attivata (APTT). Il coagulo si può rilevare solamente mediante misurazione -meccanica, -manuale oppure foto-ottica

REAGENTI

ATTENZIONE: ESCLUSIVAMENTE PER USO DIAGNOSTICO IN -VITRO

1. Reagente PHOSPHOLIN ES

Ingredienti: Il reagente contiene 0,1mM di acido ellagico con fosfolipidi derivati dalla lecitina di soia. Sono stati aggiunti tamponi, stabilizzatori e conservanti.

Preparazione per l'uso: Il reagente è confezionato pronto per l'uso. La fiala deve essere capovolta più volte, fino ad ottenere una sospensione omogenea.

Conservazione e stabilità: Il reagente **PHOSPHOLIN ES** deve essere conservato ad una temperatura tra i 2 e gli 8°C quando non viene utilizzato ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla fiala.

NON METTERE NEL CONGELATORE.

Segni di deterioramento: Normalmente il reagente è una soluzione omogenea. È possibile che si formi un sedimento che dovrebbe dissolversi facilmente miscelando per capovolgimento. Qualora il plasma o i controlli normali non rientrino nei limiti dei controlli di qualità di laboratorio definiti, è possibile che ciò sia un segno di deterioramento del prodotto.

2. Reagente di cloruro di calcio

Ingredienti: 0,025M di cloruro di calcio

Preparazione per l'uso: Il reagente è confezionato pronto per l'uso.

Conservazione e stabilità: Il reagente 0,025M di cloruro di calcio ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla fiala.

Strumenti

È possibile determinare il tempio APTT con **PHOSPHOLIN ES** utilizzando strumenti di coagulazione semiautomatizzati ed automatizzati.

Prelievo e gestione dei campioni

NOTA: Dopo la raccolta iniziale di sangue intero, durante la verifica tutte le provette, le siringhe e le pipette devono essere di plastica.

CE

Version Española

USO PREVISTO

El reactivo de TTPA **Fosfolina ES** es un reactivo con base de ácido elágico con fosfolípidos de soja, tampones, estabilizantes y conservantes. La Fosfolina ES ha sido diseñada para su uso como reactivo del tiempo de trombolastina parcial activada (TTPA). La prueba de TTPA es un ensayo cualitativo que se utiliza para la detección rutinaria de la coagulación del plasma del paciente con el fin de detectar deficiencias en las vías intrínsecas. También se utiliza para supervisar la terapia con heparina y en la detección de anticoagulantes lúpicos. La Fosfolina ES debe ser utilizada por personal de laboratorio cualificado.

RESUMEN Y PRINCIPIO

El tiempo de trombolastina parcial activada (TTPA) se utiliza para detectar desórdenes en el sistema de coagulación intrínseco, lo que incluye los factores de coagulación II, V, VIII IX, XI y XII. En los sistemas de ensayo que cuantifican estos factores se utiliza habitualmente una versión modificada del TTPA. El TTPA se utiliza normalmente para la detección prequirúrgica de deficiencias de los factores intrínsecos (1), de supervisión de la terapia con heparina (2) y de detección de anticoagulantes lúpicos (3).

En la prueba de detección selectiva, el tiempo de trombolastina parcial activada mide indirectamente la formación de trombina mediante su acción sobre los fibrinógenos cuyo resultado es un coágulo de fibrina. En la prueba, el plasma de la prueba citratado se mezcla con el reactivo TTPA durante un periodo de tiempo específico (normalmente 3 minutos) a 37 °C y, a continuación, se añade cloruro de calcio (0,025 M) precalentado (37 °C). El tiempo de coagulación comienza al añadir el cloruro de calcio. El tiempo (en segundos) necesario para la formación de coágulos es el tiempo de trombolastina parcial activada (TTPA). La detección de coágulos puede realizarse mediante una medición mecánica, manual o fotoóptica.

REACTIVOS

ATENCIÓN: DISEÑO ÚNICAMENTE PARA

DIAGNÓSTICOS IN-VITRO

1. Reactivo FOSFOLINA ES

Composición: El reactivo contiene ácido elágico de 0,1 mM con fosfolípidos derivados de lecitina de soja. Se han añadido tampones, estabilizantes y conservantes.

Preparación para el uso: El reactivo se suministra en un envase listo para su uso. El vial debe invertirse en varias ocasiones hasta obtener una suspensión homogénea.

Almacenamiento y estabilidad: El reactivo **FOSFOLINA ES** debe almacenarse a una temperatura de 2 a 8 °C si no se está utilizando y permanece estable hasta la fecha indicada en el vial.

2. Reactivo de cloruro de calcio

Composición: 0,025 de cloruro de calcio

Preparación para el uso: El reactivo se suministra en un envase listo para su uso.

Almacenamiento y estabilidad: El reactivo 0,025 de cloruro de calcio permanece estable hasta la fecha indicada en el vial.

NO CONGELAR.

Señales de deterioro: El reactivo se presenta normalmente en una solución homogénea. Es posible que se forme sedimentación sobre el fondo que debería disiparse fácilmente con una simple mezcla por inversión. Si las pruebas de plasma normal o los controles no alcanzan los intervalos de control de calidad establecidos por el laboratorio, puede indicar el deterioro del producto.

Instrumentos

Los tiempos de TTPA se pueden determinar con **FOSFOLINA ES** utilizando instrumentos de coagulación semiautomáticos y automáticos.

Manipulación y recogida de la muestra

NOTA: Tras la recogida inicial de sangre completa, todos los tubos de ensayo, las jeringuillas y las pipetas deben ser de plástico durante las pruebas.

Muestra: Plasma obtenido a partir de sangre completa anticoagulada con citrato sódico de 0,1 M. Debe evitarse el uso de muestras hemolizadas, lipémicas o icteréricas, ya que estas condiciones pueden influir en los resultados, especialmente si se utilizan instrumentos fotoópticos.

Recogida de la muestra: Deben añadirse inmediatamente nueve partes de sangre completa recién recogida a una parte de anticoagulante.

Preparación de la muestra: Centrifugue la muestra de sangre completa a 2.500 xg durante 15 minutos (NCCLS H21-A2, 1991). Separe inmediatamente el plasma de los glóbulos rojos mediante una pipeta de plástico y colóquelo en un tubo de ensayo de plástico. Realice el ensayo de tiempo de trombolastina parcial activada en un plazo de 2 horas.

Almacenamiento y estabilidad: Antes y durante las pruebas la muestra de plasma se debe mantener en tubos de ensayo de plástico a una temperatura de 2 a 8 °C para asegurar su estabilidad. Si las pruebas se retrasan más de 2 horas, el plasma se puede almacenar hasta un mes a una temperatura de -20 °C o inferior. Las muestras congeladas deben descongelarse rápidamente a 37 °C antes de realizar las pruebas.

Materiales incluidos: Los materiales necesarios para los ensayos con **FOSFOLINA ES** se incluyen en envases con las siguientes configuraciones.

FOSFOLINA ES

Viales de reactivo 5 x 5 mL, Fosfolina ES
Viales de reactivo 5 x 5 mL, 0,025 de cloruro de calcio
Viales de reactivo 5 x 10 mL, Fosfolina ES
Viales de reactivo 5 x 10 mL, 0,025 de cloruro de calcio

Materiales y equipo necesarios no incluidos: Equipo de coagulación o baño de agua a 37 °C y cronómetro Copas de reacción o tubos de ensayo de plástico Pipetas para 1,0 y 0,1 mL

Centrifuga

Agua destilada o desionizada

Plasma de control:

- PlasmaCon N
- PlasmaCon L-1
- PlasmaCon L-2

Procedimiento de la prueba para el TTPA

NOTA: Todos los tubos de ensayo, las jeringuillas y las pipetas utilizadas durante las pruebas deben ser de plástico.

1. Métodos automáticos y semiautomáticos

Si va a utilizar un instrumento para realizar la prueba, consulte el manual del usuario de los equipos correspondientes para obtener instrucciones.

II. Método manual

1. Extraiga la muestra de sangre según lo indicado en la SECCIÓN

MANIPULACIÓN Y RECOGIDA DE LA MUESTRA.

2. Centrifugue la muestra de sangre completa anticoagulada a 2.500 xg durante 15 minutos o un equivalente en fuerza/tiempo.

3. Mientras la muestra de sangre centrifuga, reconstituya el plasma de control siguiendo el prospecto incluido con cada control.

4. Inmediatamente después de la centrifugación, separe el plasma de los glóbulos rojos y colóquelo en un tubo de plástico a una temperatura de 2 a 8 °C hasta que se realice le ensayo. El tiempo máximo de almacenamiento a una temperatura de 2 a 8 °C es de 2 horas.

5. Coloque el reactivo de cloruro de calcio de 0,025 M en un tubo de ensayo y precaliéntelo a 37 °C (durante unos 5 minutos).

6. Pipetee 100 µL del plasma del paciente o de plasma de control en un tubo de reacción.



R2 Diagnostics, Inc.
South Bend, Indiana USA (574) 288-4377



Enzyme Research Laboratories, Ltd.
Swansea, UK

LL-4501 Rev. C

PHOSPHOLIN ES

Activated Partial Thromboplastin Time



7. Mezcle con suavidad el reactivo **FOSFOLINA ES** mediante inversión para que cualquier sedimento vuelva a quedar suspendido.

8. Pipetee 100 µL de reactivo **FOSFOLINA ES** en el tubo de reacción que contiene el plasma del paciente o el plasma de control.

9. Incube el reactivo **FOSFOLINA ES** y el plasma del paciente a 37 °C durante 3-5 MINUTOS.

10. Añada 100 µL de cloruro de calcio de 0,025 M precalentado, a la vez que inicia el cronómetro y registra el tiempo (en segundos) necesario para la formación de coágulos.

11. Los resultados de la prueba (tiempo de coagulación) se obtienen directamente en segundos al igual que el tiempo de TTPA.

Supervisión de heparina

Al usar la prueba de TTPA para supervisar la terapia con heparina, es importante crear una curva de referencia *in-vitro* que refleje la respuesta media a la heparina, ya que cada paciente responde de forma diferente a la heparina. Generalmente, el intervalo terapéutico aceptado de heparina es de 0,3 a 0,7 unidades/mL. Se deben tener en cuenta las siguientes precauciones al supervisar una terapia con heparina.

- El tiempo de recogida es importante, ya que la heparina tiene una vida media *in-vivo* de sólo 1,5 horas.
- Se debe establecer un examen inicial de TTPA para cada paciente antes de comenzar la terapia para determinar el grado de respuesta de TTPA de cada paciente. Este dato se debe correlacionar con la curva de respuesta a la dosis de heparina establecida por el laboratorio de pruebas.
- Las curvas de respuesta a las dosis de heparina deben crearse utilizando la misma heparina que se utiliza para uso terapéutico con el fin de eliminar variables relacionadas con preparados de heparina que provienen de diferentes fuentes (p. ej., de mucosa porcina o de pulmón de bovino).
- Las curvas de respuesta a las dosis de heparina deben volver a establecerse con cada nuevo número de lote del reactivo.

Control de calidad

Cada laboratorio debe fijar un programa de control de calidad que incluya controles normales y anormales para evaluar el equipo, el reactivo y la actuación del técnico. Los controles normales y anormales deben realizarse diariamente antes de llevar a cabo pruebas con plasma de pacientes. Es recomendable realizar mensualmente gráficas de control de calidad (Levi Jennings) para determinar la media y la desviación típica del plasma de control.

Se recomiendan un control normal, como PlasmaCon N, y controles anormales de nivel 1 y nivel 2, como PlasmaCon L-1 y PlasmaCon L-2. Si el resultado de los controles no está dentro de sus intervalos de referencia, los resultados del paciente deben considerarse no válidos y no deben registrarse.

Resultados

Los resultados de la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada deben registrarse en segundos, al igual que el TTPA. Estos resultados se deben interpretar en relación con el intervalo normal de pruebas de TTPA de cada laboratorio. Los tiempos que son más largos o cortos que el intervalo normal pueden ser indicativos de una condición anormal en el sistema de coagulación de los pacientes.

Límites

Los valores esperados para la prueba de TTPA varían de un laboratorio a otro, en función de la técnica utilizada. El método de detección de coágulos, la temperatura, el pH, la técnica de recogida, el tipo de anticoagulante y el tiempo y método de almacenamiento de la muestra son muy importantes. Por lo tanto, los laboratorios deben establecer sus propios valores de referencia esperados para los pacientes y unos niveles de rendimiento bien definidos para el plasma de control. Además, debe prestarse mucha atención al estado de la muestra. Debe evitarse el uso de muestras hemolizadas, lipémicas o ictericas,

ya que estas condiciones pueden influir en los resultados, especialmente si se utilizan instrumentos fotoópticos.

VALORES ESPERADOS

Se realizó un estudio para obtener un intervalo de referencia utilizando muestras de plasma congelado de 40 adultos sanos normales. Se utilizó aproximadamente el mismo número de hombres que de mujeres. Los resultados del TTPA fueron los siguientes:
FOSFOLINA ES
(N= 40)

	Media (segundos)	Intervalo para +/- 2 DT
FOTOÓPTICO	29,8	23,2 – 36,4
MECÁNICO	31,8	27,1—36,5

Estos valores deben utilizarse exclusivamente como orientación. Debido a las diferencias que pueden existir entre diferentes instrumentos, laboratorios y poblaciones locales, es recomendable que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia para los valores de TTPA esperados.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

I. Estudios de precisión

Se realizaron estudios de precisión para establecer los CV intraanálisis y entre análisis para el plasma de control normal y el plasma de control anormal. Para estos estudios se utilizó un único número de kit **Fosfolina ES**. Los resultados se muestran a continuación:

Intraanálisis (TTPA en segundos)

Control	N	Media (segundos)	D.T.	C.V.
PlasmaCon N	30	29,3	0,2	0,9 %
PlasmaCon L-2	30	88,2	0,6	0,6 %

Entre análisis (TTPA en segundos)

Control	N	Media (segundos)	D.T.	C.V.
PlasmaCon N	15	30,6	0,68	2,24 %
PlasmaCon L-2	15	91,4	2,61	2,85 %

II. Estudios comparativos

A. Pruebas de pacientes: se realizó una comparación entre el reactivo **FOSFOLINA ES** y otro reactivo comercial mediante muestras con actividades de coagulación normales y anormales debido a la terapia con heparina, a deficiencias de los factores o a ambas. El ensayo se realizó con 140 muestras, evaluadas por triplicado.

Los parámetros de las ecuaciones de regresión lineal fueron:

Fotoóptic	pendiente = 0,864	r = 0,92
Mecánico	pendiente = 1,0929	r = 0,93

REFERENCIAS:

- Proctor R.R, Rapaport S.I., The Partial Thromboplastin Time with Kaolin, AM.J.Clin. Path. 36:212-219, 1961.
- Brandt J.T., Triplett D.A., Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments on the APTT. AM.J.Clin. Path. 76: 530-537, 1981.
- Kelsey P.R., The Diagnosis of Lupus Anticoagulants by the Partial Thromboplastin Time, Thromb. Haemost. 52: 172-175, 1984.



R2 Diagnostics, Inc.
South Bend, Indiana USA (574) 288-4377

EC REP

Enzyme Research Laboratories, Ltd.
Swansea, UK

LL-4501 Rev. C