



Soluplastin

Tromboplastina cálcica para la determinación del
Tiempo de Protrombina en una etapa

SIGNIFICACION CLINICA

El tiempo de protrombina o Tiempo de Quick es el test de screening de mayor importancia clínica en la evaluación de desórdenes de la vía extrínseca de la coagulación. Su sensibilidad a alteraciones cuali y cuantitativas de factores de la vía extrínseca y común, le permite ser empleado en:

- Detección de deficiencias simples o combinadas de factores, por alteraciones hereditarias o adquiridas (hepatopatías, deficiencia de vitamina K, etc.).
- Estudios prequirúrgicos.
- Determinación específica de la actividad de factores: II, V, VII y X.
- Monitoreo de terapia con anticoagulantes orales, por su sensibilidad a factores vitamina K dependientes (II, VII y X).

FUNDAMENTOS DEL METODO

El método se basa en la medición del tiempo de formación del coágulo de fibrina, al agregar una tromboplastina cálcica a un plasma citratado.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: liofilizado de tromboplastina de cerebro de conejo con una concentración final de 10 mM de cloruro de calcio.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- Agua bidestilada o desionizada.
- Solución fisiológica.
- **Coagulation Calibrator** de Wiener lab.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

- Abrir el vial quitando el precinto metálico y retirando lentamente el tapón de goma para evitar pérdidas del material.
- Agregar el volumen de agua bidestilada o desionizada indicado en el rótulo. Tapar, dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente y luego homogeneizar la solución por agitación suave antes de su uso.
- Volver a homogeneizar cada vez que se emplee.

PRECAUCIONES

El reactivo es para uso diagnóstico "in vitro". Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivo A: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Reactivo A reconstituido: una vez reconstituido el reactivo es estable 5 días en refrigerador (2-10°C). No congelar.

MUESTRA

Plasma citratado

a) Recolección: obtener sangre cuidadosamente (evitando estasis o trauma) y colocar en un tubo con anticoagulante en proporción 9 + 1 exacta (ejemplo: 4,5 ml de sangre + 0,5 ml de anticoagulante). Mezclar suavemente. Centrifugar durante 15 minutos a 2500g y separar el plasma antes de los 30 minutos. Es recomendable efectuar la extracción con jeringas plásticas.

b) Aditivos: para obtener el plasma se debe emplear **Anti-coagulante TP** de Wiener lab. o citrato de sodio 130 mmol/l (3,8%) o 109 mmol/l (3,2%).

c) Sustancias interferentes conocidas:

- No debe emplearse EDTA o heparina para obtener plasma.
- Las contaminaciones, visibles o no, son causa de tiempos falsamente prolongados.
- Hemólisis y lipemias visibles dificultan la medición fotométrica de los resultados.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el plasma debe mantenerse a temperatura ambiente hasta el momento de efectuar el ensayo (no conservar a 2-10°C) Este período no debe prolongarse más de 4 horas. En caso de no procesarse en este lapso, el plasma puede congelarse hasta 2 semanas a -20°C. En este caso la muestra debe ser congelada inmediatamente y deberá ser descongelada rápidamente a 37°C, no prolongando más de 10 minutos este período.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Tubos de Khan o hemólisis.
- Pipetas y micropipetas para medir los volúmenes indicados.
- Baño de agua a 37 ± 1°C o coagulómetro semiautomático o automático.
- Cronómetro.

PROCEDIMIENTO

- 1- Precalentar el Reactivo A a 37°C (no más de 20 minutos)

- 2- En un tubo precalentado a 37°C, colocar 100 µl de muestra.
Incubar 1 minuto en baño de agua a 37°C.
- 3- Disparar el cronómetro con el agregado de 200 µl del Reactivo A precalentado. Previo al tiempo estimado de coagulación, sacar el tubo del baño, deslizando suavemente el contenido líquido desde el fondo hasta la mitad del tubo y detener el cronómetro en el momento de aparición del coágulo.
- 4- Registrar el tiempo de formación del coágulo.
- 5- Repetir la determinación y promediar el resultado para cada muestra. Si la diferencia entre los replicados es mayor a 5%, se aconseja repetir el procedimiento.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados pueden expresarse de distintas formas:

1- Tiempo de Protrombina (TP) en segundos.

2- Porcentaje de Actividad Protrombínica (%TP)

Preparar una curva de calibración para cada lote de reactivo a partir de un plasma calibrador (**Coagulation Calibrator** de Wiener lab.) o de un pool de plasmas frescos (por lo menos 20 plasmas de individuos sanos con TP entre 90-110%) empleando solución fisiológica como diluyente:

Curva de Porcentaje de Actividad Protrombínica

Tubo N°	SF (ml)	Calibrador (ml)	Actividad (%)	Actividad (%)
1	-	1,0	100*	A x 1
2	0,3	0,7	70	A x 0,70
3	0,5	0,5	50	A x 0,50
4	0,7	0,3	30	A x 0,30
5	0,8	0,2	20	A x 0,20
6	0,9	0,1	10	A x 0,10

La preparación de las diluciones debe realizarse inmediatamente antes de realizar la curva.

Determinar el TP de cada dilución por duplicado y graficar en papel milimetrado las medias de TP en función de % de actividad o en papel log-log para linealizar la curva de calibración.

*Cuando se utiliza el kit **Coagulation Calibrator** se considera como 100% el valor de actividad dada en el inserto de dicho kit (A) y para el resto de las diluciones se multiplica dicho valor por el factor de dilución realizada.

La curva de calibración debe realizarse cada vez que se cambia de lote de reactivo o cuando el control de calidad lo indique.

Para un coagulómetro semiautomático, procesar las diluciones de la curva e ingresar las medias de TP obtenidas en la metodología de calibración del TP del instrumento. Con la calibración cargada en el instrumento, los TP (seg) de cada muestra serán interpolados automáticamente por el software

del instrumento, obteniendo en cada caso la actividad protrombínica correspondiente.

En el caso de un coagulómetro automático, las diluciones son realizadas por el instrumento y a partir de la curva de calibración obtenida, las muestras ensayadas son informadas directamente con su % de actividad protrombínica.

3- Según la World Health Organization (WHO), los resultados de TP (segundos) de pacientes bajo tratamiento con anticoagulantes orales en fase estable, deben ser expresados en INR o RIN (Razón Internacional Normalizada) para independizarse del sistema de medición (reactivo/Instrumento) utilizado, a través de la siguiente fórmula:

$$\text{RIN: } (\text{TP paciente} / \text{MNPT})^{\text{ISI}}$$

donde:

TP paciente: media del Tiempo de Protrombina del paciente en segundos.

MNPT: media geométrica del TP de la población normal adulta. Se calcula para cada lote de reactivo con al menos 20 muestras de plasmas frescos de individuos adultos sanos. ISI: índice de sensibilidad Internacional. Es obtenido para cada sistema de medición: reactivo/instrumento, a través de las recomendaciones de la WHO.

Para un coagulómetro semiautomático y automático, ingresar en la metodología los valores de ISI y MNPT del sistema específico: reactivo/instrumento. De esta manera, las muestras ensayadas serán informadas directamente con su RIN correspondiente.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Plasma Control normal - patológico de Wiener lab.
Coagulation Control N - Coagulation Control P de Wiener lab.
Los controles son procesados de la misma manera que las muestras.

VALORES DE REFERENCIA

70 - 120%

10 -14 segundos (rango orientativo - depende del sistema de medición)

En general se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia, dentro de su población de pacientes.

Los rangos terapéuticos de RIN pueden variar según las indicaciones de la terapia con anticoagulantes orales.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Toda modificación en la extracción, relación sangre/anticoagulante, procesamiento y conservación de la muestra ocasionará un resultado erróneo en la determinación.

Las muestras hemolizadas y/o coaguladas deben ser descartadas. Conservar las muestras de plasma a temperatura ambiente para evitar la activación por baja temperatura. Ver MUESTRA. La presencia de anticoagulante lúpico o inhibidores de la trombina pueden afectar la determinación alterando los resultados.

La preincubación del reactivo a 37°C, no debe exceder los

20 minutos. Por otra parte, es conveniente que el reactivo reconstituido permanezca en la heladera cuando no se usa, no permaneciendo a temperatura ambiente por largos períodos. Se requiere una nueva calibración para cada lote de reactivos e instrumento utilizado.

PERFORMANCE

a) Imprecisión: evaluada a través del protocolo EP5A del CLSI procesando: controles y muestras de pacientes.

Precisión intraensayo

Muestra	Nivel	D.S.	C.V.
Plasma Control normal	12,5 seg	± 0,1 seg	1,0%
Plasma Control patológico	31,7 seg	± 0,4 seg	1,4%
Pool de plasmas normales	11,2 seg	± 0,1 seg	1,3%
Pool de plasmas patológicos	15,4 seg	± 0,2 seg	1,3%

Precisión total

Muestra	Nivel	D.S.	C.V.
Plasma Control normal	12,5 seg	± 0,4 seg	2,9%
Plasma Control patológico	31,7 seg	± 1,0 seg	3,2%
Pool de plasmas normales	11,2 seg	± 0,3 seg	3,0%
Pool de plasmas patológicos	15,4 seg	± 0,4 seg	2,4%

b) Correlación: se compararon los resultados de RIN de 105 pacientes sanos y en fase estable de tratamiento con anticoagulantes orales, obtenidos con **Soluplastin** y un kit comercial de similar principio, obteniéndose los siguientes parámetros de correlación:

$$y = 0,9562 x + 0,1087 \quad (R^2 = 0,9825)$$

PRESENTACION

- Kit para 100 determinaciones (10 x 2 ml) (Cód. 1705001).
- Kit para 200 determinaciones (10 x 4 ml) (Cód. 1705005).
- Kit para 320 determinaciones (8 x 8 ml) (Cód. 1705003).

BIBLIOGRAFIA

- Quick, A.J. - "Fisiología y Patología de la Hemostasis" - Ed. El Ateneo, Buenos Aires (1952).
- Araldi, H.T., et al. - "Primer Reactivo Nacional Argentino de Referencia de Tromboplastina de Cerebro Humano" - Acta Bioquím. Clín. Latinoam. XVI/1:131 (1982).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 28: Normalización de la Vigilancia del Tratamiento Anticoagulante (oral) - Serv. Inf. Tec. N° 610:49-56 (1977).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 31: Requerimientos para Tromboplastinas y Plasmas usados en la terapia anticoagulante oral - Serv. Inf. Téc. N° 658:202-223 (1981).
- Suñer Casadevall, F. - "Nuevas Normas Internacionales para la Expresión del Tiempo de Quick" - Análisis Clínicos X/40:240-245 (1985).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests". AACC Press, 4th ed., 2001.



Soluplastin

Tromboplastina cálcica para a determinação do Tempo de Protrombina em uma etapa

SIGNIFICADO CLÍNICO

O tempo de protrombina ou Tempo de Quick é a prova de triagem mais importante clinicamente na avaliação de distúrbios da via extrínseca da coagulação. A sensibilidade a alterações quali e quantitativas de fatores das vias extrínseca e comum da coagulação permite que seja utilizado para:

- a detecção de deficiências simples ou combinadas de fatores devido a alterações hereditárias ou adquiridas (doenças hepáticas, deficiência de vitamina K, etc.);
- estudos pré-cirúrgicos;
- determinação específica da atividade de fatores II, V, VII e X;
- controle da terapêutica com anticoagulantes orais pela sua sensibilidade a fatores vitamina K dependentes (II, VII e X).

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

O método baseia-se na medição do tempo de formação do coágulo de fibrina, pela adição de uma tromboplastina de cálcio a um plasma citrado.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: tromboplastina liofilizada de cérebro de coelho a uma concentração final de cloreto de cálcio 10 mM.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- Água bidestilada ou deionizada.
- Solução salina.
- **Coagulation Calibrator** da Wiener lab.

INSTRUÇÕES PARA USO

- Abra o frasco quebrando o lacre metálico e remova lentamente a rolha de borracha para evitar perdas do material.
- Adicione o volume de água bidestilada ou deionizada indicado no frasco. Tampe. Deixe repousar por 30 minutos a temperatura ambiente e depois agite suavemente até obter uma suspensão homogênea.
- Volte a homogeneizar quando utilizar novamente a suspensão.

PRECAUÇÕES

O reagente é para uso diagnóstico "in vitro". Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como se fossem capazes de transmitir infecção. Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análise clínica. Todos os reagentes e as amostras devem-se descartar conforme à regulção local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagente A: estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicado na embalagem.

Reagente A reconstituído: sob refrigeração (2-10°C) é estável por 5 dias a partir do momento de sua reconstituição. Não congelar.

AMOSTRA

Plasma citrado

a) Coleta: obter o sangue cuidadosamente (evitando estase ou trauma) e colocar em um tubo com anticoagulante na proporção 9 + 1 exatamente (ex.: 4,5 ml de sangue + 0,5 ml de anticoagulante). Misturar suavemente. Centrifugar por 15 minutos a 2500g e separar o plasma antes de 30 minutos. É aconselhável realizar a extração com seringas de plástico.

b) Aditivos: para obter o plasma deve-se utilizar **Anticoagulante TP** de Wiener lab ou citrato de sódio 130 mmol/l (3,8%) ou 109 mmol/l (3,2%).

c) Substâncias interferentes conhecidas:

- a presença de heparina ou EDTA invalida os resultados;
- as contaminações, visíveis ou não, causam tempos falsamente prolongados;
- hemólise e lipemia visíveis dificultam a medição foto-óptica dos resultados.

Referência bibliográfica Young para os efeitos de drogas no presente método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: o plasma deve ser mantido a temperatura ambiente até o momento de efetuar o ensaio (não armazenar a 2-10°C). No caso de a amostra não se processar dentro das 4 horas contadas desde a coleta, pode ser congelada (a -20°C) por duas semanas. Neste caso, a amostra deve ser congelada imediatamente e deve ser descongelada rapidamente a 37°C, não prolongando-se este período mais de 10 minutos.

MATERIAL NECESSÁRIO

- Tubos de Khan ou hemólise.
- Pipetas e micropipetas para medir os volumes indicados.
- Banho-maria a 37±1°C ou coagulômetro semi-automático ou automático.
- Cronômetro.

PROCEDIMENTO

- 1- Pré-aquecer o Reagente A a 37°C (não mais do que 20 minutos).

- 2- Em um tubo pré-aquecido a 37°C, colocar 100 ul de amostra.
Incubar 1 minuto em banho-maria a 37°C.
- 3- Disparar o cronômetro com a adição de 200 ul de Reagente A pré-aquecido. Antes do tempo de coagulação estimado, retirar o tubo do banho-maria, deslizando suavemente o líquido a partir do fundo para o meio do tubo e parar o cronômetro no momento da aparecimento do coágulo.
- 4- Registrar o tempo de formação do coágulo.
- 5- Repetir a determinação e calcular a média para cada amostra. Se a diferença entre as repetições é maior do que 5% é aconselhável repetir o procedimento.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados podem ser expressos de diversas formas:

1- Tempo de protrombina (TP) em segundos.

2- Percentual de Atividade de Protrombina (%TP)

Preparar uma curva de calibração para cada lote de reagente a partir de um plasma calibrador (**Coagulation Calibrator** da Wiener lab.) ou de um pool de plasmas frescos (pelo menos 20 plasmas de indivíduos saudáveis com TP entre 90-110%) utilizando solução salina como diluente:

Curva de Percentual de Atividade de Protrombina

Tubo N°	SS (ml)	Calibrador (ml)	Atividade (%)	Atividade (%)
1	-	1,0	100*	A x 1
2	0,3	0,7	70	A x 0,70
3	0,5	0,5	50	A x 0,50
4	0,7	0,3	30	A x 0,30
5	0,8	0,2	20	A x 0,20
6	0,9	0,1	10	A x 0,10

A preparação das diluições deve se realizar imediatamente antes de realizar a curva.

Determinar o TP de cada diluição em duplicado e representar graficamente em papel milimetrado as médias de TP vs a percentagem de atividade ou em papel log-log para a linearização da curva de calibração.

*Quando é utilizado o kit **Coagulation Calibrator** é considerado como 100% o valor de atividade indicado nas instruções de uso do kit (A) e para as outras diluições deve-se multiplicar este valor pelo fator de diluição realizada.

A curva de calibração deve-se realizar cada vez que seja mudado o lote de reagente ou quando seja indicado pelo controle de qualidade.

Caso seja utilizado um coagulômetro semi-automático, processe as diluições da curva e ingresse as médias de TP obtidas na calibração de TP do instrumento.

Com a calibração carregada no instrumento, os TP de cada amostra vão ser interpolados automaticamente pelo software

do instrumento, obtendo-se em cada caso a atividade de protrombina correspondente.

Caso seja utilizado um coagulômetro automático, as diluições são realizadas pelo instrumento e a partir da curva de calibração obtida, as amostras ensaiadas são informadas com a sua % de atividade de protrombina.

3- Conforme à Organização Mundial de Saúde (OMS), os resultados de TP (segundos) de pacientes tratados com anticoagulantes orais em fase estável, devem ser expresso em INR ou RIN (Razão Internacional Normalizado) para se independizar do sistema de medição (reagente / instrumento) utilizado através da seguinte fórmula:

RIN: $(TP \text{ paciente} / MNPT)^{ISI}$

onde:

TP paciente: média do Tempo de Protrombina do paciente (em segundos).

MNPT: média geométrica do TP da população adulta normal. É calculada para cada lote de reagente com pelo menos 20 amostras de plasma fresco de indivíduos adultos saudáveis. ISI: índice de sensibilidade internacional. É obtido para cada sistema de medição (reagente / instrumento) através das recomendações da OMS.

Para um coagulômetro semi-automático ou automático, ingresse os valores de ISI e MNPT do sistema específico: reagente / instrumento. Assim, as amostras ensaiadas vão ser informadas com o RIN correspondente.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Plasma Control normal - patológico da Wiener lab.

Coagulation Control N - Coagulation Control P da Wiener lab. Os controles são processados da mesma maneira que as amostras.

VALORES DE REFERÊNCIA

70-120%

10 - 14 segundos (faixa indicativa, depende do sistema de medição)

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência.

As faixas terapêuticas de RIN podem variar de acordo com as indicações da terapia com anticoagulantes orais.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. Qualquer alteração na coleta da amostra, relação anticoagulante/amostra, processamento ou armazenamento da mesma pode ocasionar resultados errados na determinação. Amostras hemolisadas ou coaguladas devem ser descartadas. As amostras devem ser conservadas a temperatura ambiente para evitar a ativação pela baixa temperatura. Vide AMOSTRA.

A presença de lúpus anticoagulante ou inibidores de trombina podem afetar a determinação produzindo resultados errados. A pré-incubação do reagente a 37°C não deve exceder os 20 minutos. Além disso, é desejável que o reagente reconstituído permaneça no refrigerador quando não estiver em

uso, não permanecendo à temperatura ambiente durante longos períodos.
Uma nova calibração é requerida para cada lote de reagente ou instrumento utilizado.

- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

DESEMPENHO

a) Imprecisão: os estudos de imprecisão foram realizados através do protocolo EP5-A do CLSI processando controles e amostras de pacientes.

Precisão intra-ensayo

Amostra	Nível	D.P.	C.V.
Plasma Control normal	12,5 seg	± 0,1 seg	1,0%
Plasma Control patológico	31,7 seg	± 0,4 seg	1,4%
Pool de plasmas normais	11,2 seg	± 0,1 seg	1,3%
Pool de plasmas patológicos	15,4 seg	± 0,2 seg	1,3%

Precisão total

Amostra	Nível	D.P.	C.V.
Plasma Control normal	12,5 seg	± 0,4 seg	2,9%
Plasma Control patológico	31,7 seg	± 1,0 seg	3,2%
Pool de plasmas normais	11,2 seg	± 0,3 seg	3,0%
Pool de plasmas patológicos	15,4 seg	± 0,4 seg	2,4%

b) Correlação: foram comparados os resultados de RIN em 105 pacientes saudáveis e em fase estável de tratamento com anticoagulantes orais, obtidos com Soluplastin da Wiener lab. e um kit comercial baseado no mesmo princípio, obtendo-se os seguintes parâmetros de correlação:

$$y = 0,9562 x + 0,1087 \text{ (R}^2 = 0,9825\text{)}$$

APRESENTAÇÃO

- 10 x 2 ml Reagente A (Cód. 1705001).
- 10 x 4 ml Reagente A (Cód. 1705005).
- 8 x 8 ml Reagente A (Cód. 1705003).

O número de determinações informado no rótulo do produto é obtido quando utilizada a técnica manual. Consulte o nosso Departamento Técnico para obter informações a respeito do rendimento deste produto em equipamentos automáticos e semiautomáticos da Wiener lab.

REFERÊNCIA

- Quick, A.J. - "Fisiología y Patología de la Hemostasis"- Ed. El Ateneo, Buenos Aires (1952).
- Araldi, H.T. et al. - "Primer Reactivo Nacional Argentino de Referencia de Tromboplastina de Cerebro Humano" - Acta Bioquim.Clin. Latinoam. XVI/1:131 (1982).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 28: Normalización de la Vigilancia del Tratamiento Anticoagulante (oral) - Serv. Inf. Téc. N° 610:49-56 (1977).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 31: Requerimientos para Tromboplastinas y Plasmas usados en la terapia anticoagulante oral - Serv. Inf. Téc. N° 658:202-223 (1981).
- Suñer Casadevall, F. - "Nuevas Normas Internacionales para la Expresión del Tiempo de Quick"- Análisis Clínicos X/40:240-245 (1985).



Soluplastin

Calcium thromboplastin for the determination of one-stage
Prothrombin Time

SUMMARY

Prothrombin time or Quick Time is a screening test of major clinical importance in the evaluation of disorders of the extrinsic coagulation pathway. Its sensitivity to qualitative and quantitative alterations of factors of the extrinsic and common pathway allows it to be used in:

- Detection of simple or combined factor deficiencies, due to hereditary or acquired alterations (hepatopathies, vitamin K deficiency, etc.).
- Pre-surgical studies.
- Specific determination of factor II, V, VII and X activity.
- Monitoring of therapy with oral anticoagulants, due to its sensitivity to vitamin K dependent factors (II, VII and X).

PRINCIPLE

The method is based on measuring the formation time of the fibrin clot by adding calcium thromboplastin to a citrated plasma.

PROVIDED REAGENTS

A. Reagent A: Lyophilized rabbit brain thromboplastin with a final concentration of 10 mM calcium chloride.

NON-PROVIDED REAGENTS

- Bidistilled or deionized water.
- Saline solution.
- **Coagulation Calibrator** from Wiener lab.

INSTRUCTIONS FOR USE

- Open a vial removing the metal precinct and slowly pulling out the rubber stopper to avoid any loss of material.
- Add the bidistilled or deionized water volume indicated on the label. Cover, let stand for 30 minutes at room temperature and then homogenize the solution by gentle agitation before use.
- Homogenize each time before use.

WARNINGS

The Reagent is for "in vitro" diagnostic use.

All patient samples should be handled as if they were capable of transmitting infection.

Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

The reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Reagent A: is stable in refrigerator (2-10°C) until the expiration date shown on the box.

Reconstituted Reagent A: in refrigerator (2-10°C) is stable for 5 days from its reconstitution. Do not freeze.

SAMPLE

Citrated plasma

a) Collection: obtain blood carefully (avoiding stasis or trauma) and place it in a tube with anticoagulant in an exact 9 + 1 proportion (e.g.: 4.5 ml blood + 0.5 ml anticoagulant). Mix gently. Centrifuge for 15 minutes at 2500g and separate the plasma before 30 minutes. Collection using plastic syringes is recommended.

b) Additives: to obtain plasma, Wiener lab's **Anticoagulant TP**, or 130 mmol/l (3,8%) or 109 mmol/l (3,2%) sodium citrate should be used.

c) Known interfering substances:

- Do not use EDTA or heparin for plasma collection.
- Contaminations, visible or not, yield falsely extended times;
- Visible hemolysis and lipemias interfere with the photooptical reading of the results.

See Young, D.S. in References for effect of drugs on the present method.

d) Stability and storage instructions: plasma should be kept at room temperature until tested (do not store at 2-10 °C). This period should not be extended for more than 4 hours. If plasma is not processed within this period, it must be frozen for up to 2 weeks at -20°C. This procedure should be done promptly, as well as the thawing at 37°C, not extending this period longer than 10 minutes.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Khan or hemolysis tubes
- Micropipettes and pipettes for measuring the stated volumes
- Water bath at 37°C
- Stopwatch

PROCEDURE

- 1- Preheat Reagent A at 37°C (no longer than 20 minutes).
- 2- In a preheated tube at 37°C, place 100 µl sample. Incubate for 1 minute in water bath at 37°C.
- 3- Start the stopwatch with the addition of 200 µl preheated Reagent A. Before the estimated coagulation time, remove the tube from the water bath, gently slide the liquid content from the bottom to the middle of the tube and stop the stopwatch at clot formation.
- 4- Record the clot formation time.
- 5- Repeat the determination and average the result for each sample. If the difference between replicates is greater than 5%, it is advisable to repeat the procedure.

INTERPRETATION OF RESULTS

The results can be expressed in different ways:

1- Prothrombin Time (PT) in seconds.

2- Prothrombin Activity Percentage (%PT)

Prepare a calibration curve for each batch of reagent from a calibrator plasma (**Coagulation Calibrator** from Wiener lab.) or from a pool of fresh plasmas (at least 20 plasmas from healthy individuals with 90-110% PT) using saline solution as diluent:

Curve of Prothrombin Activity Percentage

Tube N°	SF (ml)	Calibrator (ml)	Activity (%)	Activity (%)
1	-	1.0	100*	A x 1
2	0.3	0.7	70	A x 0.70
3	0.5	0.5	50	A x 0.50
4	0.7	0.3	30	A x 0.30
5	0.8	0.2	20	A x 0.20
6	0.9	0.1	10	A x 0.10

The preparation of the dilutions should be done immediately before the curve.

Determine the PT of each dilution in duplicate and plot on graph paper the PT means in terms of activity % or on log-log paper to linearize the calibration curve.

* When the **Coagulation Calibrator** kit is used, the activity value given in the kit's insert (A) is considered to be 100% and for the rest of the dilutions the said value is multiplied by the dilution factor.

The calibration curve must be performed each time the reagent batch is changed or when the quality control indicates so.

For a semi-automatic coagulometer, process the dilutions of the curve and enter the PT averages obtained in the calibration method of the instrument PT. With the calibration loaded in the instrument, the PT (sec) of each sample will be automatically interpolated by the instrument software, obtaining in each case the corresponding prothrombin activity.

In the case of an automatic coagulometer, the dilutions are performed by the instrument from the calibration curve obtained, the samples tested are reported directly with their prothrombin activity %.

3 - According to the World Health Organization (WHO), PT results (seconds) of patients undergoing treatment with oral anticoagulants in stable phase, should be expressed in INR (International Normalized Ratio) to be independent of the measurement system (reagent/Instrument) used, using the following formula:

$$\text{INR: (PT patient / MNPT)}^{\text{ISI}}$$

where:

Patient PT: mean of the patient's Prothrombin Time in seconds.

MNPT: PT geometric mean of the adult normal population. It is calculated for each batch of reagent with at least 20 samples of fresh plasmas from healthy adult subjects.

ISI: International sensitivity index. It is obtained for each measurement system: reagent/instrument, using WHO recommendations.

For a semi-automatic and automatic coagulometer, enter ISI and MNPT values of the specific system into the method: reagent / instrument. Thus, the samples tested will be reported directly with their corresponding INR.

QUALITY CONTROL METHOD

Plasma Control Normal - Patológico from Wiener lab.

Coagulation Control N - Coagulation Control P from Wiener lab.

The controls are processed in the same way as the samples.

REFERENCE VALUES

70-120%

10-14 seconds (reference range - depends on the measurement system).

It is recommended that each laboratory establish its own reference intervals within its patient population.

INR therapeutic ranges may vary according to the indications for the oral anticoagulant therapy.

PROCEDURE LIMITATIONS

See Known interfering substances under SAMPLE.

Any modification in the collection, blood/anticoagulant ratio, processing and storage of the sample will cause an erroneous result in the determination.

Hemolyzed and / or coagulated samples should be discarded. Store plasma samples at room temperature to avoid low temperature activation. See SAMPLE.

The presence of lupus anticoagulant or thrombin inhibitors may affect the determination by altering the results.

The preincubation of the reagent at 37°C should not exceed 20 minutes. On the other hand, it is recommended to store the reconstituted reagent in the refrigerator when not in use. Avoid leaving the reagent at room temperature for extended periods of time.

A new calibration is required for each batch of reagents and instrument used.

PERFORMANCE

a) Reproducibility: precision studies were performed following the guidelines contained in NCCLS (National Committee on Clinical Laboratory Standards) EP5-A document.

Intra-assay precision

Sample	Level	S.D.	C.V.
Normal Control Plasma	12.5 sec	± 0.1 sec	1.0%
Pathological Control Plasma	31.7 sec	± 0.4 sec	1.4%
Pool of normal plasmas	11.2 sec	± 0.1 sec	1.3%
Pool of pathological plasmas	15.4 sec	± 0.2 sec	1.3%

Total precision

Sample	Level	S.D.	C.V.
Normal Control Plasma	12.5 sec	± 0.4 sec	2.9%
Pathological Control Plasma	31.7 sec	± 1.0 sec	3.2%
Pool of normal plasmas	11.2 sec	± 0.3 sec	3.0%
Pool of pathological plasmas	15.4 sec	± 0.4 sec	2.4%

b) Correlation: the results of INR from 105 healthy patients in a stable treatment phase with oral anticoagulants obtained with **Soluplastin** and a commercial kit of similar principle were compared, and the following correlation parameters were obtained:

$$y = 0.9562 x + 0.1087 (R^2 = 0.9825)$$

WIENER LAB. PROVIDES

- Kit for 100 tests (10 x 2 ml) (Cat. 1705001).
- Kit for 200 tests (10 x 4 ml) (Cat. 1705005).
- Kit for 320 tests (8 x 8 ml) (Cat. 1705003).

REFERENCES

- Quick, A.J. - "Fisiología y Patología de la Hemostasis" - Ed. El Ateneo, Buenos Aires (1952).
- Araldi, H.T., et al. - "Primer Reactivo Nacional Argentino de Referencia de Tromboplastina de Cerebro Humano" - Acta Bioquím. Clín. Latinoam. XVI/1:131 (1982).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 28: Normalización de la Vigilancia del Tratamiento Anticoagulante (oral) - Serv. Inf. Tec. N° 610:49-56 (1977).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 31: Requerimientos para Tromboplastinas y Plasmas usados en la terapia anticoagulante oral - Serv. Inf. Téc. N° 658:202-223 (1981).
- Suñer Casadevall, F. - "Nuevas Normas Internacionales para la Expresión del Tiempo de Quick" - Análisis Clínicos X/40:240-245 (1985).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SIMBOLOS

Símbolos que podrían encontrarse en los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab. // Símbolos que podem ser encontrados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab. // Symbols that might be found on Wiener lab diagnostic reagent kits.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro" // Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro" // This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices



Representante autorizado en la Comunidad Europea // Representante autorizado na Comunidade Europeia // Authorized representative in the European Community



Uso diagnóstico "in vitro" // Uso médico-diagnóstico "in vitro" // "In vitro" diagnostic medical device



Contenido suficiente para <n> ensayos // Conteúdo suficiente para <n> testes // Contains sufficient for <n> tests



Fecha de caducidad // Data de validade // Use by



Límite de temperatura (conservar a) // Limite de temperatura (conservar a) // Temperature limitation (store at)



No congelar // Não congelar // Do not freeze



Riesgo biológico // Risco biológico // Biological risks



Volumen después de la reconstitución // Volume após a reconstituição // Volume after reconstitution



Contenido // Conteúdo // Contents



Número de lote // Número de lote // Batch code



Elaborado por: // Elaborado por: // Manufactured by:



Nocivo // Nocivo // Harmful



Corrosivo / Cáustico // Corrosivo / Caústico // Corrosive / Caustic



Irritante // Irritante // Irritant



Consultar instrucciones de uso // Consultar as instruções de uso // Consult instructions for use



Calibrador // Calibrador // Calibrator



Control // Controle // Control



Control Positivo // Controle Positivo // Positive Control



Control Negativo // Controle Negativo // Negative Control



Número de catálogo // Número de catálogo // Catalog number



Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-148



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina