en

INTENDED PURPOSE
The first standardised one-stage prothrombin time test was developed by Dr. Armand Quick in 19351. It has now become the basic coagulation screening test for the diagnosis of congential and acquired deficiencies of clotting factors from the extrinsic pathway (factors II, V, VII and X)[1,2]. It is also used for the induction and monitoring of oral anticoagulant therapy[3,4] and can be used to assess the protein synthesis capability of the liver in chronic or acute hepatic disorders.
Helena Thromboplastin-LI is of rabbit brain origin but resembles human BCT in its low International Sensitivity Index (ISI). The ISI of Helena Thromboplastin-LI is approximately 1.1 (using manual calibration techniques) and is calibrated against the WHO international reference preparation[5].
Helena Thromboplastin-LI is particularly suited to the monitoring of oral anticoagulant therapy and, in conjunction with the appropriate factor deficient plasma, the measurement of factor activity in the extrinsic pathway. Tissue thromboplastin, in the presence of calcium ions, is an activator which initiates the extrinsic pathway of coagulation. When a mixture of tissue thromboplastin and calcium ions is added to normal citrated plasma, the clotting mechanism is activated, leading to a fibrin clot. If a deficiency exists within the extrinsic pathway, the time required for clot formation will be prolonged depending on the severity of the deficiency.

WARNINGS AND PRECAUTIONS
The reagents contained in this kit are for in-vitro diagnostic use only - **DO NOT INGEST**. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HbsAg) HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody; however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

COMPOSITION
1. **Helena Thromboplastin-LI**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Each vial contains rabbit brain thromboplastin suspension. The contents of the vial should be mixed well before and during use. The reagent is a fine suspension of rabbit brain tissue.
2. **Calcium Chloride Solution**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Each vial contains 0.025M calcium chloride solution.
   The reagent is a clear, colourless solution.
3. **Other kit components**
   Each kit contains Instructions For Use and lot specific reference values insert.

STORAGE AND SHELF LIFE
Unopened vials are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.
1. **Helena Thromboplastin-LI**
   Opened vials are stable 1 month at 2...6°C and 5 days at 15...30°C. The working reagent (mixed with calcium chloride) is stable for 10 days at 2...6°C or 5 days at 15...30°C, AC-4 POS 25 @ 37°C = 2hrs. **DO NOT FREEZE**.
   Signs of deterioration: Large clumps of particles or changes in expected values may indicate product deterioration.
2. **Calcium Chloride Solution**
   Opened vials are stable for 1 month at 2...6°C or 5 days at 15...30°C.
   Signs of deterioration: Particulate contamination, cloudiness or a change in expected performance may indicate product deterioration.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED
REF 5519 Plasma Calibrant Set

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION
Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood (9 parts) should be collected into 3.2% or 3.8% sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 2000 - 3000 x g for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month.
Thaw quickly at 37°C prior to testing. Do not keep at 37°C for more than 5 minutes.

STEP-BY-STEP PROCEDURE
For accurate INR reporting, it is recommended to determine the laboratory specific ISI of the reagent with the testing system in use. The Helena BioSciences Europe Plasma Calibrant Set (REF 5519) is recommended for this purpose[6,7]. This should be performed for each new reagent batch. The Helena BioSciences Europe INR Reference Set (REF 5490) should be used to check for shifts in the local system ISI which have been noted with changes in laboratory temperature and post instrument servicing, amongst other local variances.
For accurate prothrombin activity reporting (%PT), it is recommended to calibrate the instrument in routine use using the Helena BioSciences Europe PT Calibration Set (REF 5504).
The use of serial dilutions of a reference plasma for the %PT curve is not recommended as this can lead to discrepancies caused by the low fibrinogen in the reference plasma dilutions which are not reflected in patient samples having predominantly normal fibrinogen levels.

1. **Automated Methods, AC-4. (REF 5265 x500 samples, REF 5267 x1000 samples, REF 5269 x2000 samples)**
   Refer to the appropriate AC-4 Operators Manual for detailed instructions.
   Prepare all reagents as instructed under 'composition'.

START=7s	METHOD= Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=50µL Pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µl
INCUB=0s	MATH=Log Y	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL
RUNTIME =120s	SENS=2	T-CORR= +45% / -5 sec S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=100µL Pos=25

2. **Manual Methods**
a) Mix sufficient Helena Thromboplastin-LI and calcium chloride solution to complete the anticipated testing for the day and incubate at 37°C for no more than 8 hours.
b) Pre-warm 0.1ml of the test plasma at 37°C for 2 minutes.
c) Add 0.2ml of freshly mixed thromboplastin reagent to the plasma while simultaneously starting a stopwatch.
d) Note the time for clot formation to the nearest 0.1 seconds.

INTERPRETATION OF RESULTS
Results should be reported to the nearest 0.1 seconds and duplicates should agree within 5% of each other.
INR values can be calculated using the following formula:

INR = (PT Time Patient) / (Mean Normal PT Time) ^{ISI}

%PT values can be interpolated from the calibration graph (%PT of PT Calibration plasmas versus measured clot time), which should be a straight line when plotted on log-log graph paper.

QUALITY CONTROL
Each laboratory should establish a quality control program.
Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, patient results should be considered invalid.
Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

REF 5186	Norm-Trol 1	10 x 1ml
REF 5499	Norm-Trol 1	10 x 3ml
REF 5187	Ab-Trol 2	10 x 1ml
REF 5183	Ab-Trol 3	10 x 1ml
REF 5490	INR Reference Set	12 x 0.5ml

REFERENCE VALUES
Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish it's own normal range. This is particularly important for local ISI calibration.
Using the manual (tilt-tube) technique, normal values ranging from 12.5 - 16.5 seconds are typical.

Therapeutic Ranges:
The British Society for Haematology8 recommend the following INR ranges for various clinical conditions:

INR	Clinical State
2.0-2.5	Prophylaxis of deep vein thrombosis, including surgery on high risk patients. (2.0-3.0 for for hip surgery and fractured femur operations).
2.0-3.0	Treatment of deep vein thrombosis. Pulmonary embolism. Systemic embolism. Prevention of venous thrombo-embolism in myocardial infarction. Mitral stenosis with embolism. Transient ischaemic attacks. Atrial fibrillation.
3.0-4.5	Recurrent deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Arterial disease, including myocardial infarction. Mechanical prosthetic heart valves.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS
The following performance characteristics have been determined by Helena BioSciences or their representatives as a guideline.
Each laboratory should establish it's own performance data.
Reproducibility (using the Behnk RackRotor):

Within assay reproducibility

	Clot Time (seconds)	Within Assay CV (%)
n=10	17.0	0.92
n=10	26.9	1.09

Between assay reproducibility

	Clot Time (seconds)	Between Assay CV (%)
n=100	13.7	2.09
n=100	23.0	2.38
n=100	25.6	2.15

Between batch reproducibility

Clot Time (seconds)		Between Assay CV (%)
n=3	13.1	2.0
n=3	27.3	3.3
n=3	44.0	2.2

Method Comparison: Comparison of INR values determined using Helena Thromboplastin-LI and two WHO Reference Thromboplastins yielded the following correlation equations:

Thromboplastin-LI = 0.9936 (RTF95) + 0.0129 r^2 = 0.9834 n = 79
Thromboplastin-LI = 0.9589 (BCT441) + 0.1543 r^2 = 0.9500 n = 79

BIBLIOGRAPHY

1. Quick, A.J. 'A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and Jaundice', Am. J. Med. Sci., 1935; 190: 501.
2. Biggs, Rosemary (Ed.), Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1976.
3. Hirsh, J., Poller, L., Deykin, D., Levine, J. and Dalen, J.E.,'Optimal Therapeutic Range for Oral Anticoagulants', Chest, 1989, 95: 5S-11S.
4. Poller, L. ' Laboratory Control of Anticoagulant Therapy', Sem. Thromb. Haemostasis, 1986; 12: 13-19.
5. World Health Organisation. Expert Committee on Biological Standards 1984. Technical Series 700:19.
6. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. 'The value of plasma calibrants in correcting coagulometer effects on International Normalised Ratios (INR): An international multicentre study' Amer. J. Clin. Pathol., 1995,103 : 358-365.
7. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. ÔA comparison of lyophilised artificially depleted plasmas and lyophilised plasmas from warfarin treated patients in correcting for coagulometer effects on International Normalised RatiosÕ Amer. J. Clin. Pathol., 1995, 103 : 366-371.
8. The British Society for Haematology, 'Guidelines on Oral Anticoagulation: Second Edition', J. Clin. Pathol., 1990; 43 : 177-183.

fr

UTILISATION
La première méthode de détermination standardisée du temps de prothrombine en une étape a été développée en 19351 par le Dr. Armand Quick. Cette méthode de Quick constitue désormais l'analyse de base de la coagulation servant à diagnostiquer des anomalies des facteurs de coagulation, congénitales ou acquises,
à partir de la voie extrinsèque (facteurs II, V, VII et X)[1,2]. Elle sert aussi à l'induction et au monitorage des thérapies avec anticoagulants oraux[3,4] et elle peut être utilisée pour évaluer la capacité de synthèse des protéines du foie chez les patients souffrants de troubles hépatiques chroniques ou aigus.
Le Helena Thromboplastine-ISI faible provient de cerveaux de lapin mais il ressemble au BCT humain en raison de son indice de sensibilité international (ISI) faible. L'ISI du Helena Thromboplastine-ISI faible est d'environ 1,1 (en suivant les méthodes d'étalonnage manuel) et est étalonné en comparaison avec la préparation internationale de référence de l'OMS[5]. Le Helena Thromboplastine-ISI faible convient tout particulièrement au monitorage des thérapies avec anticoagulants oraux et, utilisé conjointement au plasma carencé en un facteur approprié, à la détermination de l'activité du facteur de la voie extrinsèque.
La thromboplastine tissulaire, en présence d'ions calcium, est un activateur qui démarre la voie extrinsèque de la coagulation. Quand un mélange de thromboplastine tissulaire et d'ions calcium est ajouté à un plasma citraté normal, le processus de coagulation, qui doit conduire à la production d'un caillot fibreux, s'active. Si la voie extrinsèque présente une anomalie, le temps nécessaire à la formation du caillot est allongé suivant la gravité du trouble de la coagulation.

PRÉCAUTIONS
Les réactifs du kit sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. NE PAS INGÉRER. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination. Un dépistage des produits à base de plasma a été réalisé et a donné un résultat négatif (sauf indication contraire sur la boîte du kit ou sur le flacon) pour les antigènes de l'hépatite B (AgHBs), les anticorps anti VIH 1 et 2 et les anticorps anti VHC; il est malgré tout nécessaire de les manipuler avec les mêmes précautions que pour les échantillons de plasma humain.

COMPOSITION
1. **Helena Thromboplastine-ISI faible**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Chaque flacon contient une suspension de thromboplastine de cerveau de lapin. Le contenu du flacon doit être bien mélangé avant et pendant l'utilisation. Le réactif est une suspension fine de tissu cérébral de lapin.
2. **Solution de chlorure de calcium**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Chaque flacon contient une solution de chlorure de calcium à 0,025M. Le réactif est une solution transparente et incolore.
3. **Autres composants du kit**
   Chaque kit contient une fiche technique et les valeurs de référence spécifiques du lot.

STOCKAGE ET CONSERVATION
Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.
1. **Helena Thromboplastine-ISI faible**
   Une fois ouverts, les flacons sont stables 1 mois entre 2...6°C et 5 jours entre 15...30°C. Le réactif de travail (mélangé avec du chlorure de calcium) est stable 10 jours entre 2...6°C ou 5 jours entre 15...30°C, AC-4 POS 25 @ 37°C = 2hrs. **NE PAS CONGELER**.
   Signes de détérioration: La présence de d'amas de particules ou un écart par rapport aux valeurs prévues indique une détérioration du produit.
2. **Solution de chlorure de calcium**
   Une fois ouverts, les flacons sont stables 1 mois entre 2...6°C ou 5 jours entre 15...30°C.
   Signes de détérioration: Une contamination, un aspect floconneux ou un écart par rapport aux valeurs prévues indique une détérioration du produit.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS
REF 5519 Kit d'étalonnage du plasma

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS
Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre siliconé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 2000 - 3000 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2...6°C. L'analyse doit être terminée dans les 2 heures suivant le prélèvement de l'échantillon; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou un mois à -70°C. Décongeler rapidement à 37°C avant de réaliser l'analyse. Ne pas laisser à 37°C plus de 5 minutes.

MÉTHODOLOGIE
Pour obtenir un RNI (rapport normalisé international) précis, il est recommandé à chaque laboratoire de déterminer l'ISI spécifique du réactif avec le système d'analyse utilisé. Il est conseillé d'utiliser le kit d'étalonnage du plasma Helena BioSciences Europe (REF 5519) pour cela[6,7]. Cette opération doit être réalisée pour chaque nouveau lot de réactif. Le kit RNI de référence Helena BioSciences Europe (REF 5490) doit être utilisé pour vérifier l'existence d'un décalage de l'ISI du système local déterminé en raison d'une variation de la température du laboratoire, suite à une opération de maintenance réalisée sur l'instrument ou toute autre variable locale.
Pour déterminer l'activité de la prothrombine de façon précise (%TP), il est recommandé d'étalonner couramment l'instrument à l'aide du kit d'étalonnage du TP Helena BioSciences Europe (REF 5504).
Il est déconseillé de réaliser des dilutions du plasma de référence pour la courbe de %TP, car cela risquerait d'entraîner des divergences dues au faible taux de fibrinogène présent dans les dilutions du plasma de référence, ce qui ne serait pas représentatif des échantillons patients qui ont principalement des taux de fibrinogène normaux.

1. **Méthodes automatisées, AC-4. (5265 x500 échantillons, 5267 x1000 échantillons, 5269 x2000 échantillons**
   Se conformer au manuel d'utilisation de AC-4 correspondant pour avoir des instructions détaillées.
   Préparer tous les réactifs en suivant les indications du paragraphe Composition

START=7s	METHOD= Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=50µL Pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µl
INCUB=0s	MATH=Log Y	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL
RUNTIME =120s	SENS=2	T-CORR= +45% / -5 sec S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=100µL Pos=25

2. **Méthodes manuelles**
a) Mélanger du Helena Thromboplastine-ISI faible et de la solution de chlorure de calcium pour réaliser les analyses prévues dans la journée et incuber à 37°C pendant 8 heures au maximum.
b) Préchauffer 0,1ml de plasma à 37°C pendant 2 minutes.
c) Ajouter 0,2ml de réactif de thromboplastine fraîchement mélangé au plasma et démarrer à ce moment un chronomètre.
d) Relever le temps de formation du caillot en arrondissant au dixième de seconde.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
Les résultats doivent être indiqués en arrondissant au dixième de seconde et l'écart maximal entre eux est de 5%.
La formule suivante permet de calculer les valeurs du RNI:

RNI = (Temps TP patient) / (Temps TP moyen normal) ^{ISI}

Il est possible d'interpoler les valeurs de %TP à partir de la courbe d'étalonnage (%TP des plasmas d'étalonnage du TP par rapport au temps de coagulation mesuré), qui doit correspondre à une ligne droite quand elle est représentée sur du papier logarithmique.

CONTRÔLE QUALITÉ
Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité.
Les plasmas de contrôle, normaux et anormaux, doivent être testés avant chaque lot d'échantillons patients afin de s'assurer que l'instrument et l'opérateur offrent des performances satisfaisantes.
Si les contrôles ne donnent pas les résultats prévus, les résultats du patient doivent être considérés comme non valables.
Helena BioSciences distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit:

REF 5186	Norm-Trol 1	10 x 1ml
REF 5499	Norm-Trol 1	10 x 3ml
REF 5187	Ab-Trol 2	10 x 1ml
REF 5183	Ab-Trol 3	10 x 1ml
REF 5490	Kit RNI de référence	12 x 0,5ml

VALEURS DE RÉFÉRENCE
Les valeurs de référence peuvent varier d'un laboratoire à l'autre suivant les techniques et les systèmes utilisés. C'est pour cette raison qu'il appartient à chaque laboratoire de déterminer sa propre plage normale. Ceci est particulièrement important pour l'étalonnage de l'ISI local.
Avec la méthode manuelle (tube incliné), l'intervalle type des valeurs normales est de 12,5 – 16,5 secondes.

Plages thérapeutiques:
La British Society for Haematology8 recommande les plages de RNI suivantes en fonction de diverses conditions cliniques:

RNI	État clinique
2,0–2,5	Prophylaxie de la thrombose veineuse profonde, y compris opération chirurgicale chez les patients à haut risque. (2,0–3,0 pour les opérations des hanches ou de fracture du fémur).
2,0–3,0	Traitement de la thrombose veineuse profonde. Embolie pulmonaire. Embolie systémique. Prévention des thrombo-embolies veineuses dans l'infarctus du myocarde. Sténose mitrale avec embolie. Accident ischémique transitoire. Fibrillation auriculaire.
3,0–4,5	Thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire récidivantes. Pathologie artérielle, dont infarctus du myocarde. Prothèses mécaniques des valvules cardiaques.

PERFORMANCES
Helena BioSciences ou ses représentants ont déterminé à titre indicatif les caractéristiques de performance suivantes. Chaque laboratoire doit établir ses propres données de performance.

Reproductibilité (en utilisant un RackRotor Behnk):

Reproductibilité intra-analyse

	Temps de coag. (secondes)	CV intra-analyse (%)
n=10	17,0	0,92
n=10	26,9	1,09

Reproductibilité inter-analyse

	Temps de coag. (secondes)	CV inter-analyse (%)
n=100	13,7	2,09
n=100	23,0	2,38
n=100	25,6	2,15

Reproductibilité inter-lot

	Temps de coag. (secondes)	CV inter-analyse (%)
n=3	13,1	2,0
n=3	27,3	3,3
n=3	44,0	2,2

Comparaison de la méthode : Une comparaison des valeurs de RNI déterminées avec Helena Thromboplastine-ISI faible et deux Thromboplastines de référence OMS a permis d'obtenir les équations de corrélation suivantes:
Thromboplastine-ISI faible = 0,9936 (RTF95) + 0,0129 r^2 = 0,9834 n = 79
Thromboplastine-ISI faible = 0,9589 (BCT441) + 0,1543 r^2 = 0,9500 n = 79

BIBLIOGRAPHIE

1. Quick, A. J. 'A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and Jaundice', Am. J. Med. Sci., 1935 ; 190 : 501.
2. Biggs, Rosemary (éd.), Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2e édition, Blackwell Scientific Publications, Londres, 1976.
3. Hirsh, J., Poller, L., Deykin, D., Levine, J. et Dalen, J. E.,'Optimal Therapeutic Range for Oral Anticoagulants', Chest, 1989, 95 : 5S-11S.
4. Poller, L. ' Laboratory Control of Anticoagulant Therapy', Sem. Thromb. Haemostasis, 1986 ; 12 : 13-19.
5. Organisation mondiale de la santé. Comité d'experts de la standardisation biologique 1984. Série technique 700 : 19.
6. Poller, L., Triplett, D. A., Hirsh, J., Carroll, J. et Clarke, K. 'The value of plasma calibrants in correcting coagulometer effects on International Normalised Ratios (INR): An international multicentre study' Amer. J. Clin. Pathol., 1995, 103 : 358-365.
7. Poller, L., Triplett, D. A., Hirsh, J., Carroll, J. et Clarke, K. A comparison of lyophilised artificially depleted plasmas and lyophilised plasmas from warfarin treated patients in correcting for coagulometer effects on International Normalised Ratios, Amer. J. Clin. Pathol., 1995, 103 : 366-371.
8. The British Society for Haematology, 'Guidelines on Oral Anticoagulation: Second Edition', J. Clin. Pathol., 1990 ; 43 : 177-183.

de

ANWENDUNGSBEREICH
Die erste standardisierte Prothrombinzeit als Einstufen-Test wurde 1935 von Dr. Armand Quick entwickelt1. Mittlerweile ist er der Standard-Screeningtest in der Gerinnung zur Diagnose eines vererbten oder erworbenen Gerinnungsfaktormangels des extrinsichen Systems (Faktor II, V, VII und X)[1,2]. Er wird auch zur Einstellung und Überwachung von oralen Antikoagulanztherapien[3,4] verwendet und kann bei chronischen und akuten Lebererkrankungen zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Leber bei der Proteinsynthese herangezogen werden.
Helena Thromboplastin-Li wird aus Kaninchenhirn gewonnen, ähnelt aber mit seinem niedrigen „International Sensitivity Index" (ISI) humaner Blutgerinnungszeit. Der ISI von Helena Thromboplastin-Li liegt bei ca. 1,1 (mit manuellen Kalibrationsmethoden) und ist gegen WHO „International Reference Preparation" kalibriert[5]. Helena Thromboplastin-Li ist besonders für die Überwachung oraler Antikoagulanztherapien geeignet und, in Verbindung mit dem entsprechenden Faktor-Mangelplasma, bei der Messung von Faktoraktivitäten im extrinsischen System.
Gewebethromboplastin ist in Anwesenheit von Calcium-Ionen ein Aktivator, der das extrinsische Gerinnungssystem auslöst. Gibt man eine Mischung von Gewebethromboplastin und Calcium-Ionen zu normalem Citratplasma, wird die Gerinnungskaskade aktiviert und es bildet sich ein Fibringerinnsel. Besteht innerhalb des extrinsischen Systems ein Mangel, verlängert sich, je nach Schwere dieses Mangels, die Zeit bis zur Ausbildung eines Gerinnsels.
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen
Die Reagenzien dieses Kits sind nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. – NICHT EINNEHMEN. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung. Die Plasmaprodukte sind mit negativem Befund auf Hepatitis B Antigen (HBsAg), HIV-1 und HIV-2 Antikörper und HCV-Antikörper getestet worden (wenn nicht auf Kit-Verpackung oder Fläschchen anders bezeichnet). Sie sollten trotzdem mit derselben Vorsicht wie humane Plasmaproben behandelt werden.

INHALT
1. **Helena Thromboplastin-Li**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Jedes Fläschchen enthält eine Suspension von Thromboplastin aus Kaninchenhirn. Den Inhalt des Fläschchens vor und während des Gebrauchs gut mischen. Das Reagenz besteht aus einer feinen Suspension aus Kaninchenhirngewebe.
2. **Calcium-chlorid-Lösung**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Jedes Fläschchen enthält 0,025M Calcium-chlorid-Lösung. Das Reagenz ist eine klare, farblose Flüssigkeit.
3. **Weitere Kit-Komponenten**
   Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung mit den chargenspezifischen Referenzwerten.

LAGERUNG UND STABILITÄT
Ungeöffnete Fläschchen sind unter den auf Verpackung oder Fläschchen angegebenen Lagerbedingungen bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.
1. **Helena Thromboplastin-Li**
   Geöffnete Fläschchen sind bei 2...6°C 1 Monat und bei 15...30°C 5 Tage stabil. Die Gebrauchslösung (vermischt mit Calcium-chlorid) ist bei 2...6°C 10 Tage oder bei 15...30°C 5 Tage stabil, AC-4 POS 25 @ 37°C = 2hrs. **NICHT EINFRIEREN**.
   Anzeichen für Verfall: Große Verklumpungen oder Veränderungen in den Normalwerten können auf eine Verfall des Produkts hinweisen.
2. **Calcium-chlorid-Lösung**
   Geöffnete Fläschchen sind bei 2...6°C 1 Monat oder bei 15...30°C 5 Tage stabil.
   Anzeichen für Verfall: Schwebstoffe, Trübung oder eine Veränderung in der erwarteten Leistung des Tests kann auf einen Verfall des Produkts hinweisen.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL
REF 5519 Plasma-Kalibrations-Set

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG
Nur Plastik oder Silikonglas verwenden. Blut (9 Teile) sollte in 3,2% oder 3,8% Natriumcitrat als Antikoagulanz (1 Teil) entnommen werden. Nach 15 Minuten zentrifugieren bei 2000 - 3000 g Plasma abpipettieren. Plasma bei 2...6°C lagern. Plasma sollte innerhalb von 2 Stunden verarbeitet werden oder kann tief gefroren bei -20°C 2 Wochen oder -70°C einen Monat gelagert werden. Vor dem Testen schnell bei 37°C auftauen. Nicht länger als 5 Minuten bei 37°C stehen lassen.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE
Um einen korrekten INR zu erhalten wird empfohlen, den laborspezifischen ISI für das Reagenz mit dem verwendeten Testsystem zu bestimmen. Helena BioSciences Europe empfiehlt zu diesem Zweck das Plasma-Kalibrator-Set Kat. Nr. 5519[6,7].
Das sollte mit jeder neuen Reagenzien-Charge durchgeführt werden. Das Helena BioSciences Europe INR-Referenz-Set
(REF 5490) dient zur Überprüfung von Verschiebungen im ISI vor Ort, die unter anderem durch Veränderungen der Labortemperatur und nach Wartungsarbeiten an den Geräten festgestellt worden sind.
Für eine korrekte Bestimmung der Prothrombin-Aktivität (%PT) wird empfohlen, das Gerät für die Routinebestimmung mit dem Helena BioSciences Europe PT-Kalibrations-Set (REF 5504) zu kalibrieren. Die Verwendung einer Serienverdünnung von Referenzplasma ist für die %PT-Kurve nicht zu empfehlen, da das zu Diskrepanzen aufgrund von niedrigem Fibrinogen in den Referenzplasma-Verdünnungen führen kann, das nicht den Patientenproben entspricht, die in der Regel normale Fibrinogen-Werte haben.

1. **Automatisierte Methoden, AC-4. (5265 x500 Proben, 5267 x1000 Proben, 5269 x2000 Proben)**
   Siehe Bedienungsanleitung des verwendeten Geräts für eine genaue Anleitung.
   Alle Reagenzien wie unter „Inhalt" beschrieben vorbereiten.

START=7s	METHOD= Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=50µL Pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µl
INCUB=0s	MATH=Log Y	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL
RUNTIME =120s	SENS=2	T-CORR= +45% / -5 sec S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=100µL Pos=25

2. **Manuelle Methoden**
a) Ausreichend Helena Thromboplastin-Li und Calcium-chlorid-Lösung für das erwartete Probenaufkommen mischen und bei 37°C nicht länger als 8 Stunden inkubieren.
b) 0,1ml des zu testenden Plasmas bei 37°C 2 Minuten vorwärmen.
c) 0,2ml des frisch zubereiteten Thromboplastin-Reagenz zum Plasma pipettieren, dabei gleichzeitig Stoppuhr drücken.
d) Die Zeit bis zur Gerinnselbildung bis auf 0,1 Sekunden genau stoppen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE
Ergebnisse sollten bis auf 0,1 Sekunden genau gemessen werden und Doppelbestimmungen nicht mehr als 5% abweichen.
INR-Werte können anhand der folgenden Formel berechnet werden:

INR = (PT Zeit Patient) / (Mittelwert normale TPZ) ^{ISI}

% TPZ-Werte können ausgehend von der Kalibratorkurve interpoliert werden (% TPZ des TP-Kalibrationsplasmas zu gemessener Gerinnungszeit) und sollten auf doppeltlogarithmischem Millimeterpapier eine gerade Linie ergeben.

QUALITÄTSKONTROLLE
Jedes Labor muss für eine eigene Qualitätskontrolle sorgen. Vor jeder Testreihe mit Patientenproben müssen normale und pathologische Kontrollplasmen getestet werden, um eine zufrieden stellende Geräteleistung und Bedienung zu gewährleisten. Liegen die Kontrollen außerhalb des Normbereichs, sind die Patientenergebnisse nicht zu verwenden.
In Verbindung mit diesem Produkt bietet Helena BioSciences die folgenden Kontrollen an:

REF 5186	Norm-Trol 1	10 x 1ml
REF 5499	Norm-Trol 1	10 x 3ml
REF 5187	Ab-Trol 2	10 x 1ml
REF 5183	Ab-Trol 3	10 x 1ml
REF 5490	INR-Referenz-Set	12 x 0,5ml

REFERENZWERTE
Referenzwerte können je nach Technik und verwendetem System von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollte jedes Labor seinen eigenen Normalwertbereich erstellen. Dieses ist besonders für die ISI-Kalibration vor Ort wichtig.
Normalwerte für die manuelle Technik (Kippmethode) liegen bei 12,5 – 16,5 Sekunden.
Therapeutischer Bereich:
Die „British Society for Haematology"8 empfiehlt folgende INR-Bereiche für verschiedene klinische Bilder:

INR	Klinischer Zustand
2,0-2,5	Prophylaxe tiefer Venenthrombose, einschließlich Operation bei Hochrisikopatienten. (2,0-3,0 bei Hüft-Op und Operation von Oberschenkelbrüchen).
2,0-3,0	Behandlung tiefer Venenthrombose. Lungenembolie. Systemische Embolie. Prophylaxe Venenthrombose bei Myokardinfarkt. Mitralstenose mit Embolie. Transitorische ischämische Attacke. Vorhofflimmern.
3,0-4,5	wiederkehrende tiefe Venenthrombose und Lungenembolie. Arterienerkrankung, einschließlich Myokardinfarkt. Mechanische Herzklappenprothesen.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN
Folgende Leistungseigenschaften sind von Helena BioSciences selbst oder in ihrem Auftrag als Richtlinie bestimmt worden. Jedes Labor muss seine eigenen Werte ermitteln.
Reproduzierbarkeit (mit dem Behnk RackRotor):

Reproduzierbarkeit innerhalb des Tests

	Gerinnungszeit (Sekunden)	Innerhalb des Tests VK (%)
n=10	17,0	0,92
n=10	26,9	1,09

Reproduzierbarkeit zwischen den Tests

	Gerinnungszeit (Sekunden)	Zwischen den Tests VK (%)
n=100	13,7	2,09
n=100	23,0	2,38
n=100	25,6	2,15

Reproduzierbarkeit zwischen Testreihen

	Gerinnungszeit (Sekunden)	Zwischen den Tests VK (%)
n=3	13,1	2,0
n=3	27,3	3,3
n=3	44,0	2,2

Methodenvergleich: Der Vergleich von INR-Werten bestimmt mit Helena Thromboplastin-Li und zwei WHO Referenzthromboplastinen ergab die folgenden Korrelationsgleichungen:

Thromboplastin-Li = 0,9936 (RTF95) + 0,0129 r^2 = 0,9834 n = 79
Thromboplastin-Li = 0,9589 (BCT441) +0,1543 r^2 = 0,9500 n = 79

LITERATUR

1. Quick, A.J. 'A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and Jaundice', Am. J. Med. Sci., 1935; 190: 501.
2. Biggs, Rosemary (Ed.), Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1976.
3. Hirsh, J., Poller, L., Deykin, D., Levine, J. and Dalen, J.E.,'Optimal Therapeutic Range for Oral Anticoagulants', Chest, 1989, 95: 5S-11S.
4. Poller, L. ' Laboratory Control of Anticoagulant Therapy', Sem. Thromb. Haemostasis, 1986; 12: 13-19.
5. World Health Organisation. Expert Committee on Biological Standards 1984. Technical Series 700:19.
6. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. 'The value of plasma calibrants in correcting coagulometer effects on International Normalised Ratios (INR): An international multicentre study' Amer. J. Clin. Pathol., 1995,103 : 358-365.
7. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. ÔA comparison of lyophilised artificially depleted plasmas and lyophilised plasmas from warfarin treated patients in correcting for coagulometer effects on International Normalised RatiosÕ Amer. J. Clin. Pathol., 1995, 103 : 366-371.
8. The British Society for Haematology, 'Guidelines on Oral Anticoagulation: Second Edition', J. Clin. Pathol., 1990; 43 : 177-183.

it

PRINCIPIO
Il primo test del tempo di protrombina standardizzato venne messo a punto dal Dr. Armand Quick nel 19351. Attualmente, questo test è diventato il metodo basilare di screening della coagulazione per la diagnosi di deficienze congenite ed acquisite dei fattori di coagulazione dal percorso estrinseco (fattori II, V, VII e X)[1,2]. Questo test viene utilizzato anche per l'induzione e il monitoraggio della terapia anticoagulante orale[3,4] e può essere impiegato per valutare la capacità di sintesi proteica del fegato in disordini epatici cronici o acuti.
Il kit Helena Thromboplastin-LI è realizzato a partire da cervello di coniglio, ma rassomiglia a BCT umano in termini di basso indice di sensibilità internazionale (ISI). L'ISI del kit Helena Thromboplastin-LI è approssimativamente pari a 1,1 (se si utilizzano tecniche di calibrazione manuali) ed è calibrato rispetto alla preparazione di riferimento internazionale dell'OMS[5]. Il kit Helena Thromboplastin-LI è particolarmente indicato per il monitoraggio della terapia anticoagulante orale e, in combinazione con plasma carente del fattore appropriato, per la misurazione dell'attività del fattore nel percorso estrinseco. In presenza di ioni di calcio, la tromboplastina tissutale è un attivatore che dà inizio al percorso di coagulazione estrinseco. Quando una miscela di tromboplastina tissutale e di ioni di calcio viene aggiunta a normale plasma citrato, si attiva il meccanismo di coagulazione che porta alla formazione di un coagulo di fibrina. Qualora sussista una deficienza all'interno del percorso estrinseco, il tempo richiesto per la formazione del coagulo risulterà prolungato in funzione della gravità della deficienza.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI
I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro - **NON INGERIRE.** Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti. I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

COMPOSIZIONE
1. **Helena Thromboplastin-LI**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Ogni flacone contiene una sospensione di tromboplastina di cervello di coniglio. Il contenuto del flacone deve essere miscelato accuratamente prima e durante l'uso. Il reagente è costituito da una sospensione fine di tessuto cerebrale di coniglio.
2. **Soluzione di calcio cloruro**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Ogni flacone contiene 0,025M di soluzione di calcio cloruro.
   Il reagente è costituito da una soluzione incolore trasparente.
3. **Altri componenti del kit**
   Ogni kit contiene un foglio procedurale e un inserto recante i valori di riferimento specifici per il lotto.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ
I flaconi non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit.
1. **Helena Thromboplastin-Li**
   I flaconi aperti sono stabili per 1 mese a 2...6°C e per 5 giorni a 15...30°C. Il reagente attivo (miscelato con calcio cloruro) è stabile per 10 giorni a 2...6°C o per 5 giorni a 15...30°C, AC-4 POS 25 @ 37°C = 2hrs. **NON CONGELARE.**
   Segni di deterioramento: Ammassi consistenti di particelle o variazioni nei valori previsti possono essere indice di deterioramento del prodotto.
2. **Soluzione di calcio cloruro**
   I flaconi aperti sono stabili per 1 mese a 2...6°C o per 5 giorni a 15...30°C.
   Segni di deterioramento: La contaminazione particellare,
   la torbidità o una variazione delle prestazioni previste possono essere indice di deterioramento del prodotto.

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE
REF 5519 Plasma Calibrant SetN.

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE
Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro siliconizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodio citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000 - 3000 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per 1 mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire il test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

PROCEDURA
Per un rilevamento accurato dell'INR si raccomanda di determinare l'ISI specifico del laboratorio per il reagente con il sistema di test in uso. A tale scopo si raccomanda il Plasma Calibrant Set (REF 5519) di Helena BioSciences Europe[6,7]. Questa procedura deve essere eseguita per ogni nuovo lotto di reagente. L'INR Reference Set
(REF 5490) di Helena BioSciences Europe deve invece essere utilizzato per rilevare eventuali spostamenti dell'ISI del sistema locale osservati in concomitanza con cambiamenti della temperatura del laboratorio e in seguito a manutenzione dello strumento, tra le altre variazioni locali.
Per un rilevamento accurato dell'attività di protrombina (%PT), si raccomanda di calibrare lo strumento di uso abituale utilizzando il PT Calibration Set (REF 5504) di Helena BioSciences Europe. Si sconsiglia l'impiego di diluizioni seriali di un plasma di riferimento per la curva %PT, che infatti possono dare luogo a discrepanze dovute al basso livello di fibrinogeno nelle diluizioni del plasma di riferimento, che non compaiono invece nei campioni dei pazienti con livelli di fibrinogeno prevalentemente normali.

A. Metodi automatici, AC4. (5265 x500 campioni, 5267 x1000 campioni, 5269 x2000 campioni)
Fare riferimento al manuale utente dello AC-4 appropriato per conoscere le istruzioni dettagliate
Preparare tutti i reagenti secondo le istruzioni riportate nel paragrafo COMPOSIZIONE.

START=7s	METHOD= Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=50µL Pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µl
INCUB=0s	MATH=LogY	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL
RUNTIME =120s	SENS=2	T-CORR= +45% / -5 sec S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=100µL Pos=25

2. Metodi manuali
a) Miscelare una quantità sufficiente di Helena Thromboplastin-LI e soluzione di calcio cloruro per completare i test previsti per la giornata e incubare a 37°C per un massimo di 8 ore.
b) Preriscaldare 0,1ml di plasma di prova a 37°C per 2 minuti.
c) Aggiungere al plasma 0,2ml di reagente a base di tromboplastina appena miscelato, azionando contemporaneamente un cronometro.
d) Annotare il tempo di formazione del coagulo con un'approssimazione a 0,1 secondi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI
I risultati devono essere indicati con un'approssimazione a 0,1 secondi e le ripetizioni devono corrispondere con una tolleranza del 5%.
I valori di INR possono essere calcolati utilizzando la seguente formula:

INR = (Tempo di PT Paziente) / (Tempo di PT normale medio) ^{ISI}

I valori di %PT possono essere interpolati dal grafico di calibrazione (%PT dei plasmi di calibrazione PT vs. tempo di coagulazione rilevato), che, se tracciato su carta a doppia scala logaritmica, deve apparire sotto forma di linea retta.

CONTROLLO QUALITÀ
Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normali e anormali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.
Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

REF 5186	Norm-Trol 1	10 x 1ml
REF 5499	Norm-Trol 1	10 x 3ml
REF 5187	Ab-Trol 2	10 x 1ml
REF 5183	Ab-Trol 3	10 x 1ml
REF 5490	INR Reference Set	12 x 0,5ml

VALORI DI RIFERIMENTO
I valori di riferimento possono variare da un laboratorio all'altro in funzione delle tecniche e dei sistemi in uso. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale. Ciò è particolarmente importante per la calibrazione dell'ISI locale.
Utilizzando la tecnica manuale (con inclinazione della provetta), i valori normali compresi tra 12,5 e 16,5 secondi sono tipici.

Range terapeutici:
La British Society for Haematology8 raccomanda i seguenti range di INR per varie condizioni cliniche:

INR	Stato clinico
2.0-2.5	Profilassi della trombosi delle vene profonde, compresi gli interventi chirurgici in pazienti ad alto rischio. (2.0-3.0 per le protesi d'anca e gli interventi per la frattura del femore).
2.0-3.0	Trattamento della trombosi delle vene profonde. Embolia polmonare. Embolia sistemica. Prevenzione della tromboembolia venosa nell'infarto del miocardio. Stenosi mitralica con embolia. Attacchi ischemici transitori. Fibrillazione atriale.
3.0-4.5	Trombosi delle vene profonde ricorrente e embolia polmonare. Malattia arteriosa, compreso l'infarto del miocardio. Valvole cardiache protesiche meccaniche.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI
Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida. Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare i propri dati prestazionali.

Riproducibilità (utilizzando il Behnk RackRotor):

Riproducibilità entro il dosaggio

	Tempo di coagulazione (in secondi)	CV entro il dosaggio (%)
n=10	17.0	0.92
n=10	26.9	1.09

Riproducibilità tra i dosaggi

	Tempo di coagulazione (in secondi)	CV tra i dosaggi (%)
n=100	13.7	2.09
n=100	23.0	2.38
n=100	25.6	2.15

Riproducibilità tra i lotti

	Tempo di coagulazione (in secondi)	CV tra i dosaggi (%)
n=3	13.1	2.0
n=3	27.3	3.3
n=3	44.0	2.2

Confronto dei metodi: Il confronto dei valori di INR determinati utilizzando il kit Helena Thromboplastin-LI e due tromboplastine di riferimento dell'OMS ha portato alle seguenti equazioni di correlazione:

Thromboplastin-LI = 0.9936 (RTF95) + 0.0129 r^2 = 0.9834 n = 79
Thromboplastin-LI = 0.9589 (BCT441) + 0.1543 r^2 = 0.9500 n = 79

BIBLIOGRAFIA

1. Quick, A.J. 'A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and Jaundice', Am. J. Med. Sci., 1935; 190: 501.
2. Biggs, Rosemary (Ed.), Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1976.
3. Hirsh, J., Poller, L., Deykin, D., Levine, J. and Dalen, J.E.,'Optimal Therapeutic Range for Oral Anticoagulants', Chest, 1989, 95: 5S-11S.
4. Poller, L. ' Laboratory Control of Anticoagulant Therapy', Sem. Thromb. Haemostasis, 1986; 12: 13-19.
5. World Health Organisation. Expert Committee on Biological Standards 1984. Technical Series 700:19.
6. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. 'The value of plasma calibrants in correcting coagulometer effects on International Normalised Ratios (INR): An international multicentre study' Amer. J. Clin. Pathol., 1995,103 : 358-365.
7. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. ÔA comparison of lyophilised artificially depleted plasmas and lyophilised plasmas from warfarin treated patients in correcting for coagulometer effects on International Normalised RatiosÕ Amer. J. Clin. Pathol., 1995, 103 : 366-371.
8. The British Society for Haematology, 'Guidelines on Oral Anticoagulation: Second Edition', J. Clin. Pathol., 1990; 43 : 177-183.

es

USO PREVISTO
La primera prueba estandarizada de la protrombina en una sola etapa fue desarrollada por el Dr. Armand Quick en 19351. Ahora se ha convertido en la prueba de cribado básico de la coagulación para el diagnóstico de deficiencias congénitas y adquiridas de factores de coagulación de la vía extrínseca (factores II, V, VII y X)[1,2]. Se usa también para la inducción y monitorización del tratamiento anticoagulante oral[3,4] y puede usarse para valorar la capacidad de síntesis de proteínas del hígado en trastornos hepáticos crónicos o agudos. La tromboplastina LI Helena tiene su origen en cerebro de conejo, pero se parece a la BCT humana en su bajo Índice de Sensibilidad Internacional (ISI). El ISI de Tromboplastina LI Helena es de aproximadamente 1,1 (usando técnicas de calibración manual) y se calibra contra el preparado de referencia internacional de la OMS[5].
La prueba de tromboplastina LI Helena está especialmente adaptada a la monitorización del tratamiento anticoagulante oral y, conjuntamente con el plasma deficiente en el factor oportuno, la medición de la actividad de los factores en la vía extrínseca.
La tromboplastina tisular, en presencia de iones calcio, es un activador que inicia la vía extrínseca de la coagulación. Cuando se añade una mezcla de tromboplastina tisular e iones calcio al plasma normal citratado, se activa el mecanismo de coagulación, conduciendo a un coágulo de fibrina. Si se produce una deficiencia dentro de la vía extrínseca, el tiempo necesario para la formación de coágulos se prolongará dependiendo de la intensidad de la deficiencia.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES
Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico – **NO SE DEBEN INGERIR**. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación. Los productos plasmáticos se han sometido a pruebas y han resultado negativos (a menos que se indique otra cosa en la caja del kit o en el vial) para la presencia de antígeno de la hepatitis B (HbsAg), anticuerpos de VIH 1 y 2 y anticuerpo del VHC; sin embargo, deben manipularse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

COMPOSICIÓN
1. **Tromboplastina LI Helena**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Cada vial contiene suspensión de tromboplastina de cerebro de conejo. Los contenidos del vial deben mezclarse bien antes y durante su uso. El reactivo es una suspensión fina de tejido cerebral de conejo.
2. **Solución de cloruro cálcico**
   REF 5265 (10 x 2.5ml)
   REF 5267 (10 x 5ml)
   REF 5269 (10 x 10ml)
   Cada vial contiene solución de cloruro cálcico 0,025M. El reactivo es una solución transparente, incolora.
3. **Otros componentes del kit**
   Cada kit contiene instrucciones de uso y valores de referencia específicos insertados del lote.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ
Los viales no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se conservan en las condiciones indicadas en el vial o en la etiqueta del kit.
1. **Tromboplastina LI Helena**
   Los viales abiertos son estables 1 mes a 2...6°C y 5 días a 15...30°C. El reactivo de trabajo (mezclado con cloruro cálcico) es estable durante 10 días a 2...6°C o 5 días a 15...30°C, AC-4 POS 25 @ 37°C = 2hrs.
   NO CONGELAR.
   Signos de deterioro: Los grumos grandes de partículas o los cambios en los valores esperados pueden indicar deterioro del producto.
2. **Solución de cloruro cálcico**
   Los viales abiertos son estables durante 1 mes a 2...6°C ó 5 días a 15...30°C.
   Signos de deterioro: La contaminación particulada, la turbiedad o un cambio en el rendimiento esperado pueden indicar deterioro del producto.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS
REF 5519 Set de calibración del plasma

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS
Deben usarse siempre plástico o vidrio siliconizado. Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8%
(1 parte). Se separa el plasma después de la centrifugación a 2000 - 3000 x g durante 15 minutos. El plasma debe conservarse a 2...6°C.
Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20°C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. No conservar a 37°C durante más de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO
Para la comunicación exacta del INR, se recomienda determinar la ISI específica del laboratorio del reactivo con el sistema de prueba en uso. Se recomienda el Set de calibración del Plasma de Helena BioSciences Europe (REF 5519) para este fin[6,7]. Esto debe realizarse para cada nuevo lote de reactivos. Debe usarse el Set de Referencia de INR de Helena BioSciences Europe (REF 5490) para comprobar las desviaciones en el ISI del sistema local que se han observado con cambios en la temperatura del laboratorio y el mantenimiento posinstrumental, entre otras variaciones locales.
Para una comunicación exacta de la actividad de la protrombona (%TP), se recomienda calibrar el instrumento en uso habitual usando el Set de Calibración del TP de Helena Biosciences Europe
(REF 5504). El uso de diluciones seriadas de un plasma de referencia para la curva de %TP no se recomienda, porque puede llevar a discrepancias producidas por el bajo fibrinógeno en las diluciones del plasma de referencia, que no se reflejan en las muestras de pacientes que tienen fundamentalmente niveles normales de fibrinógeno.

1. Métodos automatizados, AC-4. (5265 x500 muestras, 5267 x1000 muestras, 5269 x2000 muestras)
Consúltese el Manual del Operador del AC-4 adecuado para instrucciones detalladas.
Preparar todos los reactivos como se indica en "composición"..

START=7s	METHOD=Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=50µL pos=35 (CP)	Def. Plasma (DP) Vol=0µL
INCUB=0s	MATH=LogY	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL
RUNTIME=120s	SENS=2	T-CORR= +45% / -5 sec S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=100µL Pos=25

2. Métodos manuales
a) Mezcle suficiente Tromboplastina-LI Helena y solución de cloruro cálcico para realizar la prueba esperada para el día e incube a 37°C durante no más de 8 horas.
b) Precaliente 0,1ml del plasma de prueba a 37°C durante 2 minutos.
c) Añada 0,2ml de reactivo de tromboplastina recién mezclado al plasma mientras pone en marcha simultáneamente un cronómetro.
d) Observe el tiempo hasta la formación del coágulo procurando afinar en la décima de segundo más próxima.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
Los resultados deben comunicarse en los 0,1 segundos más próximos y las pruebas duplicadas deben estar de acuerdo entre sí dentro del 5%.
Los valores de INR pueden calcularse usando la siguiente fórmula:

INR = (Tiempo de TP Paciente) / (Tiempo de TP normal medio) ^{ISI}

Los valores de %TP pueden interpolarse a partir del gráfico de calibración (%TP de los plasmas de calibración del TP frente al tiempo de coágulo medido) que debe ser una línea recta cuando se representa en un papel de gráficos log-log.

CONTROL DE CALIDAD
Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los plasmas control normales y anormales deben estudiarse antes de cada lote de muestras del paciente, para asegurar un funcionamiento adecuado del instrumento y el operador. Si los controles no se realizan como se esperaba, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.
Helena BioSciences suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

REF 5186	Norm-Trol 1	10 x 1ml
REF 5499	Norm-Trol 1	10 x 3ml
REF 5187	Ab-Trol 2	10 x 1ml
REF 5183	Ab-Trol 3	10 x 1ml
REF 5490	Set de referencia del INR	12 x 0,5ml

VALORES DE REFERENCIA
Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal. Esto es especialmente importante para la calibración local del ISI.
Usando la técnica manual (tubo inclinado), son típicos los valores normales que van de 12,5 a 16,5 segundos.

Intervalos terapéuticos:
La British Society for Haematology8 recomienda los siguientes intervalos de INR para diversos estados clínicos:

INR	Estado Clínico
2,0-2,5	Profilaxis de la trombosis venosa profunda, incluida la cirugía en pacientes de alto riesgo. (2,0-3,0 para la cirugía de cadera y las operaciones en fémures fracturados).
2,0-3,0	Tratamiento de la trombosis venosa profunda. Embolia pulmonar. Embolia sistémica. Prevención del tromboembolismo venoso en el infarto de miocardio. Estenosis mitral con embolia. Accidentes isquémicos transitorios.Fibrilación auricular.
3,0-4,5	Trombosis venosa profunda y embolia pulmonar recidivante. Enfermedad arterial, incluido el infarto de miocardio. Válvulas cardíacas protésicas mecánicas.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES
Las siguientes características de rendimiento han sido determinadas por Helena BioSciences o sus representantes como guía. Cada laboratorio debe establecer sus propios datos de rendimiento.

Reproducibilidad (usando el Behnk RackRotor):

Reproducibilidad dentro de cada ensayo

	Tiempo de coagulación (segundos)	CV dentro de cada ensayo (%)
n=10	17,0	0,92
n=10	26,9	1,09

Reproducibilidad entre distintos ensayos

	Tiempo de coagulación (segundos)	CV dentro entre distintos ensayos (%)
n=100	13,7	2,09
n=100	23,0	2,38
n=100	25,6	2,15

Reproducibilidad entre distintos lotes

	Tiempo de coagulación (segundos)	CV dentro entre distintos ensayos (%)
n=3	13,1	2,0
n=3	27,3	3,3
n=3	44,0	2,2

Comparación del método: La comparación de los valores de INR determinados usando Tromboplastina-LI de Helena y dos Tromboplastinas de Referencia de la OMS dio las siguientes ecuaciones de correlación:

Tromboplastina LI = 0,9936 (RTF95) + 0,0129 r^2 = 0,9834 n = 79
Tromboplastina LI = 0,9589 (BCT441) + 0,1543 r^2 = 0,9500 n = 79

BIBLIOGRAFÍA

1. Quick, A.J. 'A Study of the Coagulation Defect in Hemophilia and Jaundice', Am. J. Med. Sci., 1935; 190: 501.
2. Biggs, Rosemary (Ed.), Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1976.
3. Hirsh, J., Poller, L., Deykin, D., Levine, J. and Dalen, J.E.,'Optimal Therapeutic Range for Oral Anticoagulants', Chest, 1989, 95: 5S-11S.
4. Poller, L. ' Laboratory Control of Anticoagulant Therapy', Sem. Thromb. Haemostasis, 1986; 12: 13-19.
5. World Health Organisation. Expert Committee on Biological Standards 1984. Technical Series 700:19.
6. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. 'The value of plasma calibrants in correcting coagulometer effects on International Normalised Ratios (INR): An international multicentre study' Amer. J. Clin. Pathol., 1995,103 : 358-365.
7. Poller, L., Triplett, D.A., Hirsh, J., Carroll, J. and Clarke, K. ÔA comparison of lyophilised artificially depleted plasmas and lyophilised plasmas from warfarin treated patients in correcting for coagulometer effects on International Normalised RatiosÕ Amer. J. Clin. Pathol., 1995, 103 : 366-371.
8. The British Society for Haematology, 'Guidelines on Oral Anticoagulation: Second Edition', J. Clin. Pathol., 1990; 43 : 177-183.

helena
Biosciences Europe
Partners in Good Science

Helena Thromboplastin-Li
Instructions for use

REF 5265

REF 5267

REF 5269

Helena Thromboplastin-Li
Fiche technique

Helena Thromboplastin-Li
Anleitung

Helena Thromboplastin-Li
Istruzioni per l'uso

Helena Thromboplastin-Li
Instrucciones de uso

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD
Tel. +44 (0)191 482 8440
Fax +44 (0)191 482 8442
Email info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

CE

HL-2-0439P 2007/11 (11)