

## MRX Owren's PT

Art. n.: GHI131-4, GHI131-10, GHI131-10SI, GHI131-20

Italian

### USO PREVISTO

Il reagente per il complesso protrombinico MRX Owren's PT è concepito per la determinazione dell'attività del complesso protrombinico e fornisce informazioni sull'attività dei fattori di coagulazione vitamina K-dipendenti II, VII e X.

### PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

#### FONDAMENTI E PRINCIPIO DEL METODO

Il reagente per il complesso protrombinico MRX Owren's PT è idoneo per l'analisi di plasma, sangue citrato e sangue capillare prelevato da pazienti trattati con antagonisti della vitamina K, ad esempio il warfarin, e per lo screening nella ricerca di difetti della via estrinseca.

Durante l'analisi del PT, vengono miscelati il campione e il reagente e viene misurato il tempo di coagulazione. Il volume finale del campione è pari al 4,8% (1:21). Forza ionica (0,15 M), pH (7,3), concentrazione dello ione calcio (2 mM) e temperatura (37 °C) sono simili a quelle fisiologiche.

A causa della diluizione del campione, il metodo è relativamente insensibile alle variazioni dell'attività del fattore V (FV) e all'eparina. L'insensibilità all'eparina può essere migliorata utilizzando il tamponcino di diluizione del campione contenente Polybrene (MRX152 o GHI152).

L'attività PT è stata espressa in precedenza come percentuale dell'attività plasmatica normale (rif. 1), ma più spesso è riportata come INR a causa dell'incongruenza delle percentuali di risultati PT tra vari laboratori. Il test di Owren's generalmente non è riportato in secondi.

L'attività protrombinica misurata di Owren's PT è espressa come rapporto internazionale normalizzato (International Normalisation Ratio, INR) che si calcola come quoziente tra il tempo di coagulazione del campione e quello del plasma normale (Mean Normal Prothrombin, MNPT) elevato al valore dell'indice di sensibilità internazionale (International Sensitivity Index, ISI) del metodo (rif. 2).

- $INR = (PT/MNPT)^{ISI}$
- ISI = indice di sensibilità internazionale specifico del lotto per il reagente/strumento. Il valore ISI per il reagente PT è ottenuto tramite calibrazione eseguita con calibratori di riferimento.

I valori ISI e MNPT devono essere determinati per ciascun lotto di reagente per ogni singolo sistema di misurazione in base alle procedure locali.

#### DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

MRX Owren's PT è un reagente liofilizzato costituito da tromboplastina di coniglio e una frazione plasmatica di origine bovina. La frazione plasmatica bovina contiene fibrinogeno e fattore di coagulazione V ed è altamente carente dei fattori di coagulazione II, VII e X.

Confezione:

GHI131-4	10×4 ml (dimensioni fiala 22×40 mm)
GHI131-10	10×10 ml (dimensioni fiala 22×49,5 mm)
GHI131-10SI	10 x 10 ml (dimensioni fiala 30 x 50 mm)
GHI131-20	10×20 ml (dimensioni fiala 27,5×60 mm)

Materiale necessario ma non compreso nel kit:

- CaCl<sub>2</sub> 25 mM GHI155, GHI155-2, GHI155-5, GHI155-10
- Tampone MRX150 PT o GHI150 Owren's o MRX152 PT con Polybrene o tampone GHI152 Owren's con Polybrene
- Diluente GHI154, GHI154-2, GHI154-10 o acqua tipo CLRW CLSI o equivalente (rif. 3)

#### PRECAUZIONI

Il prodotto contiene azoturo di sodio (< 0,1%) per impedire la crescita batterica. Non versare negli scarichi urbani. Evitare il contatto con la cute e con gli occhi. Per maggiori informazioni, fare riferimento alla scheda di sicurezza dei materiali.

#### RICOSTITUZIONE

È importante lasciare che il reagente, diluente (o acqua di tipo CLSI CLRW o equivalente) e CaCl<sub>2</sub>, raggiunga la temperatura ambiente (15–25 °C) prima della ricostituzione. Esiste un rischio minore di precipitazione in reagenti ricostituiti con soluzioni al di sotto dei 15 °C, per il metodo 1X. Vedere le informazioni relative alla precipitazione nel metodo di ricostituzione 1X.

Il reagente MRX Owren's PT può essere ricostituito con diversi metodi; il metodo 1X e il metodo 2X.

Metodo 1X:

Ricostituzione con diluente (acqua di tipo CLSI CLRW o equivalente)  
 Il CaCl<sub>2</sub> viene poi aggiunto al reagente ricostituito

Metodo 2X:

Ricostituzione con diluente (acqua di tipo CLSI CLRW o equivalente)  
 Il CaCl<sub>2</sub> viene aggiunto separatamente durante l'analisi nello strumento

Il metodo 1X è più comodo e spesso garantisce un rendimento migliore con molti strumenti automatici, ma richiede una maggiore pulizia del sistema, dal momento che il reagente attivato da un CaCl<sub>2</sub> è più sensibile alla contaminazione. Pertanto, l'uso di un reagente PT, inattivato a causa dell'assenza di CaCl<sub>2</sub> (metodo 2X), è in alcuni casi preferibile.

Metodo di ricostituzione 1X:

Aggiungere il diluente GHI154 o l'acqua di tipo CLSI CLRW o equivalente (rif. 5) a temperatura ambiente (15–25 °C) alla fiala di reagente, secondo la tabella seguente.

	GHI131-4	GHI131-10 GHI131-10SI	GHI131-20
Diluente GHI154 oppure acqua di tipo CLSI CLRW o equivalente	2 ml	5 ml	10 ml

Incubare per 10 minuti in 15–25 °C; mescolare all'inizio, a metà e alla fine del periodo. Il reagente si scioglierà per formare un liquido incolore e leggermente velato.

Aggiungere 25 mM CaCl<sub>2</sub> (GHI155) a temperatura ambiente alla fiala di reagente, in base alla tabella riportata di seguito.

	GHI131-4	GHI131-10 GHI131-10SI	GHI131-20
25 mM CaCl <sub>2</sub> GHI155	2 ml	5 ml	10 ml

Se il reagente (ricostituito secondo il metodo 1X) è destinato ad essere utilizzato lo stesso giorno della ricostituzione, attendere due ore dopo la ricostituzione, prima di utilizzare il reagente.

Questa procedura è intesa per l'uso del reagente solo nello stesso giorno della ricostituzione. Se il reagente deve essere utilizzato per diversi giorni, si consiglia vivamente di ricostituire il reagente il giorno prima dell'uso; vedere la sezione Condizioni di conservazione e stabilità.

È importante miscelare il reagente prima dell'uso, ma non è necessario continuare a mescolare quando il reagente è conservato nello strumento.

In rare occasioni, possono verificarsi piccole precipitazioni nel reagente 1X ricostituito, soprattutto se il reagente ricostituito è conservato in frigorifero o se il reagente, il diluente e il CaCl<sub>2</sub> sono più freddi di 15 °C alla ricostituzione. Il precipitato non influisce sui risultati o sulle prestazioni. Si consiglia di rimuovere il precipitato con una pipetta pulita prima dell'uso.

Metodo di ricostituzione 2X:

Aggiungere il diluente GHI154 o l'acqua di tipo CLSI CLRW o equivalente (rif. 5) a temperatura ambiente (15–25 °C) alla fiala di reagente, secondo la tabella seguente.

	GHI131-4	GHI131-10 GHI131-10SI	GHI131-20
Diluente GHI154 oppure acqua di tipo CLSI CLRW o equivalente	2 ml	5 ml	10 ml

Incubare per 10 minuti in 15–25 °C; mescolare all'inizio, a metà e alla fine del periodo. Il reagente si scioglierà per formare un liquido incolore e leggermente velato.

Se il reagente (ricostituito secondo il metodo 2X) è destinato ad essere utilizzato lo stesso giorno della ricostituzione, attendere un'ora dopo la ricostituzione, prima di utilizzare il reagente.

Questa procedura è intesa per l'uso del reagente solo nello stesso giorno della ricostituzione. Se il reagente deve essere utilizzato per diversi giorni, si consiglia vivamente di ricostituire il reagente il giorno prima dell'uso; vedere la sezione Condizioni di conservazione e stabilità.

È importante miscelare il reagente prima dell'uso, ma non è necessario continuare a mescolare quando il reagente è conservato nello strumento.

## MRX Owren's PT

### Art. n.: GHI131-4, GHI131-10, GHI131-10SI, GHI131-20

Italian

#### CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il reagente non aperto conservato a 2–8 °C è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla fiala.

Stabilità dopo la ricostituzione

7 giorni a 2–8 °C, nella fiala originale chiusa

5 giorni a 15–25 °C, nella fiala originale chiusa

La conservazione a temperatura ambiente (15–25 °C) è raccomandata per i reagenti ricostituiti secondo il metodo 1X.

Se il reagente ricostituito deve essere utilizzato per diversi giorni, si consiglia vivamente di ricostituire il reagente il giorno prima dell'uso per ottenere una stabilità di 5 giorni (conservazione a 15–25 °C) o 7 giorni (conservazione a 2–8 °C).

Questa raccomandazione si basa sulle variazioni minori osservate per l'International Sensitivity Index (ISI) durante le prime 12–24 ore dopo la ricostituzione, seguite da una stabilizzazione del valore ISI per 5 (conservazione a 15–25 °C) e 7 giorni (conservazione a 2–8 °C) dopo la ricostituzione. I dati di stabilità specifici del lotto sono presentati nel certificato del prodotto.

#### RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Si raccomanda di raccogliere e conservare i campioni in conformità alle istruzioni H21-A5 (rif. 4) dell'Istituto per gli standard clinici e di laboratorio (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI): unire 9 parti di sangue venoso prelevato al momento a 1 parte di citrato trisodico 0,13 M, quindi miscelare immediatamente e accuratamente.

Il rapporto è fondamentale; un riempimento insufficiente o la presenza di un coagulo nel campione lo rendono inutilizzabile.

Il plasma è ottenuto per centrifugazione di sangue contenente anticoagulanti per 15 minuti a 2500 g entro 24 ore. Prima della centrifugazione accertarsi dell'assenza di coaguli nel campione.

#### METODO DI ANALISI

Per una descrizione dettagliata relativa ai parametri e alle prestazioni del test, fare riferimento alle applicazioni specifiche dello strumento. Attenersi alle differenti applicazioni per plasma, sangue citrato e sangue capillare.

Prediluzioni per plasma, sangue citrato e sangue capillare

- 100 µl di plasma + 600 µl di tampone Owren's 1:7
- 50 µl di sangue capillare + 200 µl di tampone Owren's 1:5
- 50 µl di sangue citrato (1+9) + 170 µl di tampone Owren's 1:4,4

Procedura per il plasma

Analisi con reagente ricostituito con il metodo 1X

- 100 µl di plasma diluito 1:7 preriscaldato a 37 °C
- 200 µl di reagente PT 1X preriscaldato a 37 °C

Analisi con reagente ricostituito con il metodo 2X

- 100 µl di plasma diluito 1:7 preriscaldato a 37 °C
- 100 µl di reagente PT 2X preriscaldato a 37 °C
- Miscelare plasma e reagente PT
- Aggiungere 100 µl di CaCl<sub>2</sub> 25 mM preriscaldato a 37 °C

Procedura relativa a entrambi i metodi: miscelare immediatamente e lasciare reagire a 37 °C. Annotare il tempo di coagulazione che è pari all'intervallo trascorso tra l'ultima aggiunta e il verificarsi della coagulazione. Il valore PT-INR si calcola tramite l'equazione  $INR = (PT/MNPT)^{ISI}$ .

Risultato dell'analisi:

Intervallo normale INR 0,92–1,20 (70–130%)

Trattamento anticoagulante orale ottimale con antagonisti della vitamina K:

INR 2-3 (15–25%) (rif. 5)

#### CALIBRAZIONE

Calibrare il sistema di misurazione attenendosi alle procedure locali o alle linee guida per Owren's PT.

#### CONTROLLO DI QUALITÀ (non compreso nel kit)

Per un controllo di qualità affidabile delle prestazioni si raccomanda di usare plasma di controllo MediRox (controllo a 2 livelli GHI 162-GHI170 o controllo a 3 livelli MRX170-MRX183) con una frequenza rispondente alle buone pratiche di laboratorio.

#### LIMITAZIONI E SOSTANZE INTERFERENTI

I risultati del PT possono essere alterati dal campionamento ematico insufficiente, che causa una variazione del rapporto tra citrato sodico e plasma del paziente, oppure dalla presenza di sostanze interferenti, ad esempio eparina, acido etilendiamminotetraacetico (EthyleneDiamineTetraacetic Acid, EDTA) e vitamina K.

Il PT non viene alterato dalla presenza di sostanze fino alle concentrazioni indicate di seguito:

Eparina UFH*	0,5 UI/ml
Trigliceridi	10 g/l
Bilirubina	0,5 g/l
Emoglobina	10 g/l

\* Eparina non frazionata (UnFractionated Heparin) e uso del tampone di diluizione MRX150/GHI150. Se si utilizza il tampone contenente Polybrene MRX152/GHI152, il reagente è insensibile all'eparina non frazionata fino alla concentrazione di 1 UI/ml. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire l'intervallo terapeutico di eparina.

Il reagente GHI131 è arricchito con fattore V (FV) bovino e fibrinogeno, per cui è insensibile alle variazioni nei campioni del paziente.

#### PRESTAZIONI TIPICHE

Analisi effettuata su ACL9000 con plasma a due livelli di INR. (n = 81)

	CV% intra-serie	CV% tra serie	CV% totale
Livello 1,00	0,7	0,5	0,9
Livello 2,30	1,5	1,2	1,9

#### BIBLIOGRAFIA

- Besselar A M H P va den. 1991. The significance of the international Normalized Ratio (INR) for oral anticoagulant therapy. JIFCC 3; 146-53
- Besselar A M H P va den. Lewis SM, Mannucci P M Poller L. 1993. Status of present and candidate International Reference Preparations (IRP) of thromboplastin for prothrombin time. Thromb Haemostas 69;85.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Fourth Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No. 22.
- CLSI Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays 5th Ed. CLSI document H21-A5 Vol. 28 No.5
- Schulman S et al 1995. A comparison of six weeks with six months of oral anticoagulant therapy after a first episode of venous thromboembolism. New Eng J Med 332:1661.