

### Quantitative determination of Prothrombin time (PT)

#### IVD

Store at 2-8°C

#### PRINCIPLE OF THE METHOD

When calcium thromboplastin is added to citrated plasma, the factors of extrinsic coagulation system are activated. The one-stage PT measures the clotting time of plasma after adding the reagent.

#### CLINICAL SIGNIFICANCE

Since its original description by Quick in 1935, the Prothrombin Time (PT) or Quick test has remained an important test for detect disorders of blood coagulation, it is the most common coagulation procedure performed in routine laboratories, apart from the APTT.

The PT is particularly sensitive to defects of the extrinsic coagulation pathway (Factors II, V, VII, X and fibrinogen) as well as its inhibitors. It is an indicator of hepatic disease.

It is also the most commonly used test for monitoring oral anticoagulant therapy. PT is commonly used for monitoring heparin anticoagulant therapy<sup>1,2,3</sup>.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

#### REAGENTS

<b>R</b>	Calcium thromboplastin lyophilized, extract of acetone dehydrated rabbit brain and CaCl <sub>2</sub> . Buffers and stabilizers.
<b>Optional</b>	CONTROL NORMAL REF: 1709104 CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

#### PREPARATION

Ref. 1709222-1709224-1709225. Working reagent (WR): Dissolve (→) one vial of R with 4.0 mL of distilled water.

Ref. 1709223. Working reagent (WR): Dissolve (→) one vial of R with 2.0 mL of distilled water.

Cap the vial and mix thoroughly to dissolve contents, avoiding foam forming. Bring to room temperature for about 15 min. before use.

Stability: 7 days at 2-8°C or 8 h at 37°C.

#### STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Do not freeze.

#### Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Quality control values outside established ranges.
- Product colour variations.

#### ADDITIONAL EQUIPMENT

- Coagulometer or stopwatch and bath at 37°C ± 0.5°C.
- General laboratory equipment <sup>(Note 1)</sup>.

#### SAMPLES

Plasma from venous puncture diluted 1/10 in trisodium citrate solution 3.8%.

Mixing immediately the blood with anticoagulant. Avoid foaming the specimen.

Centrifuge the sample at 1500 x g for 15 min and transfer the supernatant (plasma) into siliconized glass or plastic containers.

Turbid, icteric, lipemic or hemolyzed samples may generate erroneous results.

The sample is stable for 2 hours at room temperature (15-25°C) or 4 hours at 2-8°C.

#### PROCEDURE

The reagent can be used by manual method, mechanical, photo-optical or other means of clot detection <sup>(Note 2)</sup>.

#### MANUAL METHOD

1. Prewarm at 37°C the Working Reagent (WR) and the sample.
2. WR: Mix gently and pipette:

WR (µL)	200
---------	-----

3. Incubate for 5 min. at 37°C.
4. Pipette:

Citrated plasma (µL)	100
----------------------	-----

5. Start stopwatch or timer on the coagulation analyzer and determine the coagulation time.

#### CALCULATIONS

It is possible to report the results as seconds, but it is recommended use Percentage of the activity (%), PT ratio (PR) or International Normalized Ratio (INR).

$$PT \text{ ratio (PR)} = \frac{PT \text{ of the patient in sec}}{PT \text{ of normal plasma (pool \% in sec)}}$$

#### International Sensitivity Index (ISI)

The prothrombin ratio can be converted into internationally comparable values by means of the International Sensitivity Index (ISI). The result obtained is in International Normalized Ratio (INR):

$$INR = PR^{ISI}$$

#### QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures:

CONTROL NORMAL REF: 1709104

CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

#### REFERENCE VALUES

It is possible to report the results as seconds, in percentage of the normal, in prothrombin ratio, dividing the results of the sample (sec) by the results of COAGULATION CAL (sec) or in International Normalized Ratio (INR).

PT (seconds)	13-17 seg
PT (percentage)	70-120%
PT (ratio)	0.9 - 1.2

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision: The results is dependent on many factors, such as the instrument, technique and the reagent in use. The precision was assessed by testing a normal and abnormal plasma on several different instruments:

	Intraserie (n= 20)	
Plasma	Normal	Abnormal
CV (%)	1.95	2.9

#### Sensitivity:

%Factor	PT (sec)			
	Factor II	Factor V	Factor VII	Factor X
100	11.6	11.6	11.8	11.7
50	11.7	13.9	12.8	13.3
40	12.3	14.9	13.5	14.1
30	12.8	15.9	13.9	14.8
20	14.1	18.3	15.2	17.0
10	16.6	22.2	17.1	20.4

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents did not show systematic differences when compared with other commercial reagents.

#### INTERFERENCES

Do not use sodium oxalate, EDTA or heparin as anticoagulant.

Oral contraceptives, corticoids or anticoagulant therapy interfere in the assay.

A list of drugs and other interfering substances with the determination has been reported<sup>3,4</sup>.

#### NOTES

1. All labware must be clean and free of trace amounts of detergents.
2. Always follow instrument manufacturer's instructions; the results must be validated by the test laboratory.

#### BIBLIOGRAPHY

1. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
2. Arkin C et al. One stage PT and APTT; Approved Guideline vol 16 n° 3 NCCLS 996.
3. Errichetti, A.M ET AL. Management of Oral Anticoagulant Therapy : Experience with an Anticoagulation Clinic, 1984. Arch Inter Med 144: 1966-68.
4. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
5. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.

#### PACKAGING

Ref: 1709222	Cont.	4 x 4 mL
Ref: 1709223		10 x 2 mL
Ref: 1709224		10 x 4 mL
Ref: 1709225		6 x 4 mL

**Determinación cuantitativa del Tiempo de Protrombina (PT)**
**IVD**

Conservar a 2-8°C

**PRINCIPIO DEL METODO**

Los factores extrínsecos de la coagulación se activan en presencia de tromboplastina cálcica en plasma citratado. El proceso de medición del tiempo de protrombina en una etapa única, mide el tiempo de coagulación del plasma después de la adición del reactivo.

**SIGNIFICADO CLINICO**

Desde su descripción por Quick en 1935, el Tiempo de Protrombina (PT) o Tiempo de Quick ha servido para determinar trastornos de la coagulación, la PT es la determinación más frecuente junto con la APTT.

La PT es sensible a las anomalías de los factores extrínsecos de la coagulación (Factor II, V, VII, X y fibrinógeno), así como sus inhibidores. Es, además, un indicador de enfermedades hepáticas.

Se utiliza frecuentemente para la monitorización de las terapias con anticoagulantes<sup>1,2,3</sup>.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

**REACTIVOS**

<b>R</b>	Tromboplastina cálcica liofilizada, extracto de acetona deshidratada de cerebro de conejo y CaCl <sub>2</sub> . Tampón y conservantes.
<b>Opcional</b>	CONTROL NORMAL REF: 1709104 CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

**PREPARACION**

Ref. 1709222-1709224-1709225 Reactivo de trabajo (RT): Reconstituir (→) el contenido de un vial R con 4,0 mL de agua destilada.

Ref. 1709223. Reactivo de trabajo (RT): Reconstituir (→) el contenido de un vial R con 2,0 mL de agua destilada.

Tapar el vial y mezclar suavemente hasta disolver su contenido. Evitar la formación de espuma. Incubar 15 min. a temperatura ambiente, antes de su uso.

Estabilidad: 7 días a 2-8°C o 8 h a 37°C.

**CONSERVACION Y ESTABILIDAD**

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

No congelar el reactivo.

**Indicadores de deterioro de los reactivos:**

- Presencia de partículas y turbidez.
- Resultados en el Control de calidad fuera de los rangos establecidos.
- Variaciones de color.

**MATERIAL ADICIONAL**

- Coagulómetro o cronómetro y baño a 37°C ± 0.5°C.
- Equipamiento habitual de laboratorio <sup>(Nota 1)</sup>.

**MUESTRAS**

Plasma obtenido por punción venosa diluido 1/10 en solución de citrato trisódico 3.8%.

Mezclar inmediatamente la sangre con el anticoagulante. Evitar la formación de espuma.

Centrifugar la muestra a 1500 x g 15 min. y transferir el plasma a contenedores de vidrio siliconado o plástico.

Los plasmas turbios, ictericos, lipémicos o hemolizados pueden dar resultados erróneos.

La muestra es estable 2 horas a temperatura ambiente (15-25°C) o 4 horas a 2-8°C.

**PROCEDIMIENTO**

El reactivo puede emplearse en técnica manual, mecánica, foto-óptica o con cualquier instrumento apto para detectar la formación del coágulo <sup>(Nota2)</sup>.

**TÉCNICA MANUAL**

1. Calentar a 37°C el Reactivo de trabajo (RT) y la muestra.
2. RT: Mezclar suavemente por inversión y pipetear:

RT (µL)	200
---------	-----

3. Incubar 5 min. a 37°C.
4. Pipetear:

Plasma citratado (µL)	100
-----------------------	-----

5. Poner en marcha el cronómetro y medir el tiempo de formación del coágulo, inmediatamente después de la adición del reactivo.

**CALCULOS**

Los valores se pueden expresar en segundos, pero se recomienda expresarlos en Actividad porcentual (%), en Tasa de PT (PR), o en tasa internacional normalizada (INR).

$$\text{Tasa de PT (PR)} = \frac{\text{PT del paciente en segundos}}{\text{PT de plasma normal (pool %) en segundos}}$$

**Índice Internacional de Sensibilidad (ISI)**

La Tasa de PT (PR) se puede convertir a su correspondiente valor internacional usando el índice internacional de sensibilidad (ISI). De esta manera se obtiene la tasa normalizada internacional (INR): INR = PR<sup>ISI</sup>

**CONTROL DE CALIDAD**

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

CONTROL NORMAL REF: 1709104

CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

**VALORES DE REFERENCIA**

PT (segundos)	13-17 seg
PT (porcentaje)	70-120%
PT (tasa)	0,9 – 1,2

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

**CARACTERISTICAS DEL METODO**

**Precisión:** Los resultados dependen de múltiples factores como el instrumento, la técnica y el reactivo usado. La precisión ha sido asignada ensayando plasmas normales y patológicos, en diferentes instrumentos, obteniendo los siguientes resultados:

	Intraserie (n= 20)	
Plasma	Normal	Patológico
CV (%)	1,95	2,9

**Sensibilidad:**

%Factor	PT (seg)			
	Factor II	Factor V	Factor VII	Factor X
100	11,6	11,6	11,8	11,7
50	11,7	13,9	12,8	13,3
40	12,3	14,9	13,5	14,1
30	12,8	15,9	13,9	14,8
20	14,1	18,3	15,2	17,0
10	16,6	22,2	17,1	20,4

**Exactitud:** Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

**INTERFERENCIAS**

No usar como anticoagulante oxalato sódico, EDTA o heparina.

Anticonceptivos orales, corticoides o terapias con anticoagulantes pueden influir en los resultados.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en su determinación<sup>3,4</sup>.

**NOTAS**

1. El material de laboratorio usado debe estar libre de restos de detergente.
2. Seguir minuciosamente las instrucciones del fabricante del instrumento. Los resultados obtenidos deben ser validados por el laboratorio.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
2. Arkin C et al. One stage PT and APTT; Approved Guideline vol 16 n° 3 NCCLS 996.
3. Errichetti, A.M ET AL. Management of Oral Anticoagulant Therapy : Experience with an Anticoagulation Clinic, 1984. Arch Inter Med 144: 1966-68.
4. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
5. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.

**PRESENTACION**

Ref: 1709222	Cont.	4 x 4 mL
Ref: 1709223		10 x 2 mL
Ref: 1709224		10 x 4 mL
Ref: 1709225		6 x 4 mL