

MS 10310030104

COAGULAÇÃO TTPa

Kit para determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).

Kit intended for use in determining activated partial thromboplastin time (APTT).

Kit para la determinación del tiempo de Tromboplastina parcial activada (TTPa).

REF 731040-C: 40 determinações / determinations / determinaciones

REF 731080-C: 80 determinações / determinations / determinaciones

REF 731200-C: 200 determinações / determinations / determinaciones



WAMA Diagnóstica

Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT
CEP 13560-971 - São Carlos - SP - Brasil
Fone 55 16 3377-9977 / Fax 55 16 3377-9970
www.wamadiagnostics.com.br

Obelis S.A.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Phone. +(32) 2 732-59 54
Fax : +(32) 2 732-60 03
www.obelis.net



PORTUGUÊS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA
A finalidade da coagulação sanguínea é formar um coágulo no local da lesão vascular. Além da formação do coágulo, que funciona como um tampão para evitar a hemorragia, esta ação pró-coagulante deve ser restrita ao local da lesão, ou seja, ela não pode disseminar-se pelo sistema circulatório. Assim, no momento em que ocorre a lesão vascular, também se desencadeia a ação do sistema fibrinolítico e dos inibidores fisiológicos da coagulação. O modelo proposto por Macfarlane e Davie & Ratnoff, em 1964, da "cascata" para explicar a fisiologia da coagulação do sangue, usado ainda hoje por razões didáticas, divide a coagulação em uma via extrínseca e uma via intrínseca que convergem no ponto de ativação do fator X (início da via final ou comum). O TTPa avalia a via intrínseca da coagulação, portanto avalia os fatores VIII, IX, XI e XII, bem como os fatores X, V, II e I da via comum. O TTPa é usado para detecção de deficiências ou inibidores dos fatores da coagulação da via intrínseca ou comum, além de ser o teste de escolha para monitoramento da terapia de anticoagulação com heparina e para screening do anticoagulante lúpico. Ele também é sensível a presença de produtos de degradação da fibrina. O teste indicado, juntamente com o TP, quando há queixas hemorrágicas e nas rotinas pré-operatórias.

PRINCÍPIO DO MÉTODO
Para que haja a formação de um coágulo de fibrina pela via intrínseca da coagulação é necessária a presença dos fatores de coagulação I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI e XII, além de um lípido plaquetário (fosfolípido) e cálcio. O reagente **COAGULAÇÃO – TTPa** fornece um fosfolípido (cefalina), uma vez que o plasma utilizado é pobre em plaquetas e, consequentemente, não dispõe do lípido plaquetário, um ativador de contato (ácido elálgico) e cálcio (cloreto de cálcio), o qual foi removido por quelatação pelo uso do anticoagulante citrato de sódio. Portanto, quando o reagente TTPa (cefalina + ácido elálgico) é adicionado a um plasma normal citratado determinará a ativação do FXII, o qual por diluição ativará o FXI. A partir daí torna-se necessária a presença do cálcio para que a ativação dos outros fatores ocorra. O tempo levado para a formação do coágulo de fibrina após a adição do cloreto de cálcio é medido em segundos e representa o Tempo de Tromboplastina Parcial (TTPa). O grau de prolongamento do TTPa é proporcional a concentração de heparina no plasma.

APRESENTAÇÃO DO KIT
REF 731040-C - 40 determinações
1. Reagente - TTPa: 1 x 4ml
2. Cloreto de Cálcio (0,02M): 1 x 4ml
3. Instrução para uso
REF 731080-C - 80 determinações
1. Reagente - TTPa: 2 x 4ml
2. Cloreto de Cálcio (0,02M): 2 x 4ml
3. Instrução para uso
REF 731200-C - 200 determinações
1. Reagente - TTPa: 5 x 4ml
2. Cloreto de Cálcio (0,02M): 5 x 4ml
3. Instrução para uso

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO.
-Tubo
-Pipeta automática
-Banho Maria –37°C
-Cronômetro
-Recipiente para descarte de material

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES
Reagente TTPa(1): Pronto para uso. O reagente é estável até a data de validade impressa no rótulo quando armazenado entre 2 a 8°C em seu próprio frasco. O reagente TTPa é uma preparação da cefalina do cérebro do coelho e do ácido elálgico com tampão, estabilizadores e conservantes.
-Cronômetro
-Recipiente para descarte de material
Cloreto de Cálcio (0,02M)(2): Pronto para uso. O reagente é estável até a data de validade impressa no rótulo quando armazenado entre 2 a 8°C em seu próprio frasco.
Obs.: O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que seja mantida nan temperatura indicada (2-8°C).

AMOSTRAS
1. Coleta de sangue com seringa: colher sangue venoso com seringa siliconizada ou plástica. Imediatamente após transferir 9 ml de sangue para um tubo contendo 1 ml de citrato de sódio a 3,2% ou 3,8% (pode ser 4,5 de sangue para 0,5 de citrato de sódio), manter sempre a relação de 9 partes de sangue para 1 de citrato de sódio).
2. Coleta de sangue com tubo a vácuo: usar tubo a vácuo contendo citrato de sódio a 3,2% ou 3,8% (tampa azul). Assegurar-se de que o tubo após coleta esteja completo, uma vez que a relação 9 partes de sangue e 1 parte de citrato de sódio é crítica. Recomenda-se que a coleta seja feita usando-se primeiro um tubo sem anticoagulante (tubo seco). No caso da coleta ser somente para testes de coagulação, coletar dois tubos com citrato de sódio e utilizar o segundo tubo para a realização dos testes. Se coletas múltiplas, a amostra para os testes de coagulação deve ser obtida após a coleta de amostra em tubo sem anticoagulante (tubo seco), sempre antes da coleta em tubo contendo EDTA.
3. Preparação do plasma: logo após a coleta misturar gentilmente por inversão o sangue e o anticoagulante, centrifugar por 15 minutos a 2.500xg (aproximadamente 3000rpm). Se as amostras não forem processadas imediatamente, o plasma deve ser transferido para um tubo plástico. Plasma hemolizado ou contendo mais que 10.000 plaquetas/mm³ ou com hemácias presentes não são recomendados para os testes de coagulação.
4. Armazenagem do plasma: amostras de plasma podem ser armazenadas em temperatura ambiente (18 a 26°C) por até 2 horas; refrigeradas (2 a 8°C) por até 4 horas; congeladas (- 20°C) por até 2 meses ou a -70°C por até 6 meses. O plasma pode ser recentrifugado previamente ao congelamento para assegurar que todas as células sejam removidas. No momento de testar amostras congeladas, elas devem ser rapidamente descongeladas e os testes realizados imediatamente. As amostras armazenadas não devem entrar em contato com vidro e não incubá-las a 37°C por mais do que 5 minutos para evitar a perda dos fatores V e VII. Amostras mantidas por mais de 4 horas em temperatura ambiente prolonga o TTPa uma vez que o FVIII é lábil.

PROCEDIMENTO
Este procedimento é para a realização manual dos testes. Para Sistemas Semi-Automáticos ou Automáticos consultar o manual de instruções do equipamento.
1. Pré-incubar o Cloreto de Cálcio (0,02M) (2) a 37°C por no mínimo 10 minutos.
2. Pipetar 100µl do plasma a ser testado ou do plasma controle em um tubo plástico. Incubar a 37°C por 1 a 2 minutos.
3. Pipetar 100µl do reagente TTPa (1) no tubo contendo o plasma após homogeneizar a suspensão do reagente por inversão.
4. Incubar a 37°C por 3 minutos.
5. Após esse tempo, pipetar 100µl do Cloreto de Cálcio (0,02M) (2) pré-incubado, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Delicadamente por leves movimentos de inversão do tubo, registrar o tempo de coagulação do plasma em segundos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
CÁLCULO DOS RESULTADOS
Recomenda-se realizar os testes em duplicata (amostras e controles) e calcular o tempo médio. A diferença entre os resultados das duplicatas devem ser menores do que 5%. Repetir o teste se necessário.

O resultado do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado é expresso em números de segundos levados desde a adição do reagente Cloreto de Cálcio até a formação do coágulo de fibrina. No resultado pode-se incluir o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado e a Relação entre o Paciente e um Controle Normal (obtido pela determinação do TTPa de um plasma ou "pool" de plasma conhecidamente normal).

VALORES ESPERADOS
Os resultados do TTPa são influenciados pelo método de detecção do coágulo de fibrina e pode variar de laboratório para laboratório. Em geral, testes para TTPa com plasmas normais apresentarão tempos de formação do coágulo que variam de 24 a 39 segundos quando realizados em um Coagulômetro. No entanto, cada laboratório deveria estabelecer uma faixa normal usando indivíduos de sua população de pacientes. Se ocorrer mudanças no método usado (manual ou automático), técnica de coleta de sangue ou anticoagulante usado, uma nova faixa normal deveria ser estabelecida.
Faixas terapêuticas para monitoração de terapia com anticoagulante oral podem variar de laboratório para laboratório. Assim, é recomendado que cada laboratório estabeleça as faixas de TTPa relevantes para sua respectiva população de pacientes. A relação TTPa Paciente/TTPa Normal deve ser menor que 1,3; valores iguais ou superiores significam prolongamento do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado.

8. Colúidos anormais obtidos com um plasma de um paciente que não faz uso de terapia com anticoagulante pode indicar uma deficiência de um ou mais fatores da via intrínseca ou comum da coagulação, ou da presença de um inibidor de algum dos fatores destas vias. O resultado também pode ser devido a certos medicamentos. Procedimentos adicionais tais como a determinação do TP (Tempo de Protrombina) e estudos utilizando plasmas deficientes de fatores são usualmente necessários.

CONTROLE DE QUALIDADE
A confiabilidade do teste deve ser monitorada dentro de cada rotina usando plasmas controles normais e anormais, tais como os **Plasma Controle Nível 1 (COD 733001-C)**, **Plasma Controle Nível 2 (COD 733002-C)** e **Plasma Controle Nível 3 (COD 733003-C)** da **WAMA Diagnóstica**. Cada laboratório deveria estabelecer uma faixa controle para determinar a variação permitida na performance diária de cada plasma controle.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO
Precisão: a precisão dentro da rotina foi avaliada usando os **Plasmas Controles Níveis 1, 2 e 3 da WAMA Diagnóstica**, usando um procedimento manual, semi-automático (MLA Electra 900C) e um totalmente automático (ACL-100). Os resultados são mostrados na tabela.

Resultados da Precisão dentro da Rotina

Amstras	Manual	MLA Electra 900C (semi-automático)	ACL - 100 (automático)
Controle Nível 1	3,3%	2,0%	1,2%
Controle Nível 2	1,3%	2,2%	0,6%
Controle Nível 3	4,2%	2,3%	0,8%

Correlação: estudos de correlação foram realizados contra um reagente TTPa do mercado usando o Coagulômetro MLA Electra 900C e o ACL-100. Os resultados são mostrados abaixo.

Resultados da Correlação

Instrumentos	Coefficiente de Regressão	Inclinação	Intercepção
MLA Electra 900C	0,938	0,727	6,96
ACL-100	0,930	0,952	3,76

Sensibilidade a Deficiência de Fatores: os TTPas obtidos com o reagente **COAGULAÇÃO – TTPa** foram avaliados com plasmas deficientes de fator usando o Coagulômetro MLA Electra 900. Os resultados são mostrados na tabela abaixo.

Porcentagem de Fator	Tempos de Coagulação - TTPa em segundos			
	Fator VIII	Fator IX	Fator XI	Fator XII
100%	28,4	25,7	25,8	25,9
60%	28,2	27,8	28,6	29,6
50%	28,7	28,3	30,2	31,5
40%	29,6	30,7	32,0	33,2
30%	33,5	31,1	34,3	35,1
20%	35,0	32,9	36,5	38,7
10%	41,4	36,7	42,4	45,7

Esses valores devem ser usados somente como guias. Cada laboratório deve estabelecer a sensibilidade aos vários fatores usando seus próprios instrumentos, reagentes e técnicas. **Sensibilidade a Concentrações de Heparina:** a sensibilidade relativa do reagente **COAGULAÇÃO – TTPa** ao anticoagulante heparina pode ser determinada usando um plasma normal com concentrações conhecidas de heparina e medindo-se o TTPa. Os resultados do quadro abaixo foram obtidos usando o reagente **COAGULAÇÃO – TTPa** e um Coagulômetro semi-automático.

Concentração de heparina - (unidades/ml)	TTPa - Tempo de coagulação (em segundos)
0,0	23,0
0,1	28,0
0,2	38,1
0,3	59,0
0,4	76,1
0,5	99,4

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

1. Resultados discrepantes podem ser prevenidos assegurando-se de que a relação entre sangue e anticoagulante é de 9:1.
2. Amostas lipêmicas, ictericas e hemolisadas podem produzir erros na determinação do TTPa.
3. Atraso na realização do teste, dificuldade na coleta da amostra e venopunção próxima do local de aplicação de terapia com heparina podem determinar resultados falsamente prolongados de TTPa.
4. Os resultados do TTPa podem também variar com a terapia de anticoagulação empregada, dependendo do tipo e dosagem do anticoagulante, da via de administração e do tempo de administração da última dose.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS
1. Conjunto de reagentes somente para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Não usar reagentes após a data de validade.
3. Ler cuidadosamente as instruções de uso antes de realizar o teste.
4. Os reagentes devem ser homogeneizados levemente por inversão e tampados imediatamente após o uso.
5. As amostras a serem testadas e os controles devem ser utilizados ao mesmo tempo para manter as mesmas condições do teste.
6. Não ingerir. Evitar contato dos reagentes com a pele e os olhos.
7. Manusear todas as amostras como se fossem potencialmente infecciosas.
8. Descarte o material de acordo com a regulamentação local.
9. Utilizar as Boas Práticas de Laboratório (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

TERMO DE GARANTIA
A WAMA Diagnóstica garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado por sua Assessoria Técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A WAMA e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.

ENGLISH

SUMARY

The aim of blood coagulation is to form a clot in the vascular lesion region. Besides the formation of this clot, which acts as a blocker to avoid hemorrhage, this pro-coagulant action should be restricted to the lesion region, that is, it cannot be widespread in the circulatory system. Thus, the moment that occurs the vascular lesion, it also starts the fibrinolytic system action and coagulation physiological inhibitors. The "cascade" model, proposed for Macfarlane and David & Ratnoff, in 1964, in order to explain the blood coagulation physiology, still used today for didactic reasons, divide the coagulation in extrinsic and intrinsic pathways which converge on the activation point of X factor (start of the final pathway or common). APTT is sensitive to deficiencies or inhibitors of extrinsic coagulation pathway, therefore,

evaluates the VIII, IX, XI and XII factors (extrinsic pathway) and X, V, II, and I (common pathway). APTT is the method of choice for monitoring intravenous heparin anticoagulant therapy and for screening of coagulationlupus inhibitor. It is also sensitive to fibrin/fibrinogen degradation. It is also used, together with PT, in the pre-surgery routines and hemorrhagic conditions.

PRINCIPLE OF METHOD
The capacity of blood to form a fibrin clot by way of the coagulation intrinsic pathway requires coagulation factors I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI and XII, platelet lipids and calcium. **COAGULATION APTT** offers phospholipid (cephalin), since the plasma used is deficient in platelets; consequently it does not have platelet lipids, a contact activator (ellagic acid) and calcium which is removed by chelation through the use of sodium citrate anticoagulant. Therefore, APTT reagent is added to a normal citrated plasma to determine FXII activation which by cleavage will activate FXI.

Starting from this point, it is necessary the presence of calcium for the activation of other factors. The time for fibrin clot formation, after the adding of calcium chloride, is measured in seconds and represents the activated partial thromboplastin time (APTT). The APTT prolonged level is proportional to the level of heparin in the plasma.

APTT REAGENT
The APTT Reagent from **WAMA Diagnóstica** is a preparation of rabbit brain cephalin and ellagic acid activator with buffer, stabilizers and preservatives. The reagent is provided ready to use. Calcium chloride is provided separately and ready for use.

KIT PRESENTATION
REF 731040-C – 40 Determinations
REF 731080-C – 80 Determinations
REF 731200-C – 200 Determinations
1. Reagent/APTT: 1 x 4 ml
2. Calcium chloride (0.02M): 1 x 4 ml
3. Instructions for use
REF 731040-C – 80 Determinations
1. Reagent/APTT: 2 x 4 ml
2. Calcium chloride (0.02M): 2 x 4 ml
3. Instructions for use
REF 731200-C – 200 Determinations
1. Reagent/APTT: 5 x 4 ml
2. Calcium chloride (0.02M): 5 x 4 ml
3. Instructions for use

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED
- Tube
- Automatic pipette
- Double boiler– 37°C
- Timer
- Container for material disposal

PREPARATION AND STABILITY
APTT Reagent (1): Ready for use. The reagent is stable to the expiry date shown on the label when stored in the original vial at 2 to 8°C.
Calcium Chloride (0.02M) (2): Ready for use. It is stable to the expiry date shown on the label when stored in the original vial at 2 to 8°C.
Obs.: Kit presents results after its first handling and it is stable up to expiration date if stored at 2-8°C.

SPECIMEN COLLECTION
1. **Blood collection using syringe method:** Draw venous blood into a plastic or siliconized syringe. Immediately transfer 9 ml of blood into a tube containing 1 ml of 3.2% or 3.8% sodium citrate solution alternatively (4.5 of blood to 0.5 of sodium citrate, keep the ratio of 9 parts blood to 1 part sodium citrate).
2. **Blood collection using an evacuated blood collection tube:** Draw venous blood into a vacuum tube containing 3.2% or 3.8% sodium citrate solution (blue cap). Insure that a full draw has been obtained since the ratio of 9 parts blood to 1 part citrate is critical. It is recommended that the collection be performed by using the first tube without anticoagulant (dry tube). In case of collection only for coagulation tests, collect two tubes with sodium citrate and use the second tube for coagulation tests. If multiple collections are needed, the sample for coagulation test should be obtained after the collection in tube without anticoagulant (dry tube), prior to collection in tube containing EDTA.
3. **Plasma preparation:** Mix well by inversion and centrifuge at 2.500xg (approximated 3000rpm) for 15 minutes soon after the blood collection. Unless the samples are to be processed immediately, transfer the plasma into a plastic tube. Plasma that is clearly hemolyzed or contains >10.000 platelets per cubic meter or red cells is not suitable for coagulation testing.
4. **Plasma storage:** Plasma samples may be stored at room temperature (18 a 26°C) for up to 2 hours; refrigerated (2 a 8°C) for up to 4 hours; frozen (- 20°C) for up to 2 months or at -70°C for up to 6 months. Plasma may be re-centrifuged prior to freezing to assure that all cells are removed. When testing frozen samples, they should be quickly thawed and tested immediately. The samples must not have any contact with glass. Do not incubate at 37°C for longer than 5 minutes to avoid the loss of factors V and VII. Samples stored for more than 4 hours at room temperature can prolong the APTT, since FVIII is labile.

PROCEDURE
This procedure is intended to use with manual testing. For semi-automated and automated systems, please refer to your instrument manual.
1. Pre-incubate Calcium chloride (0,02M) (2) at 37°C for at least 10 minutes.
2. Pipette 100 µl of test or control plasma into a test cuvette. Incubate at 37°C for 1 to 2 minutes.
3. Pipette 100 µl of the APTT reagent (1) to the cuvette containing plasma after mixing the suspension of the reagent by inversion.
4. Incubate the mixture at 37°C for 3 minutes.
5. Rapidly add 100 µl of the pre-incubated Calcium chloride (0,02M) (2) and simultaneously start the timer.
6. Slightly mixing by inversion the tube contents, record the clotting time in seconds.

CALCULATION OF RESULTS
It is recommended to calculate the mean clotting time of duplicate samples and controls. Differences between duplicate results should be less than 5%. Repeat the test if necessary. The APTT result may be reported in seconds from the adding of the Calcium chloride up to form a fibrin clot.

APTT and ratio of patient clotting time to mean normal clotting time (obtained from APTT from plasma or pooled normal plasma) may also be reported in the test result.

EXPECTED VALUES
APTT results are influenced by the method of clot detection and can vary from laboratory to laboratory. In general, APTT tests performed on a photo-optical coagulometer will give clotting times for normal plasma in the range of 24 to 38 seconds. However, each laboratory should establish a normal range using individuals representative of its patient population. A new range should be established with any change of instrumentation, blood collection techniques, or anticoagulant.

Therapeutic ranges for monitoring oral anticoagulation therapy will vary from laboratory to laboratory. Therefore, it is essential that each laboratory establish relevant APTT ranges for its

respective patient population.
The ratio patient APTT/Mean Normal APTT should be up to 1.3. Higher or equal values mean an APTT prolonged.

Abnormal results obtained with a plasma from a patient not on anticoagulant therapy may indicate a factor deficiency or the presence of an inhibitor. The result may also be due to the effects of certain drugs and medications. Additional procedures such as the TP tests and mixing studies using factor deficient plasma are usually required.

QUALITY CONTROL

The test performance should be monitored by using normal and abnormal coagulation control plasmas such as **Control Plasma Level 1 (COD 733001-C)**, **Control Plasma Level 2 (COD 733002-C)** and **Control Plasma Level 3 (COD 733003-C)** from **WAMA Diagnóstica**. Each laboratory should establish control ranges in order to determine the allowed variation on control plasma performance.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision: Within-run precision was assessed using **Control Plasma Levels 1, 2 and 3** from **WAMA Diagnóstica**, on manual, semi-automated and fully automated instruments. The results are shown in the following table.

Within-run Precision Results

Sample	Manual	MLA Electra 900C (semi-automated)	Fully automated
Level 1	3,3%	2,0%	1,2%
Level 2	1,3%	2,2%	0,6%
Level 3	4,2%	2,3%	0,8%

Correlation: Correlation studies were performed against the APTT reagent of a competitor using a semi-automated and a fully automated coagulometer. The results are shown in the following table.

Correlation results

Instruments	Regression coefficient	Slope	Intercept
Semi-Automated	0,938	0,727	6,96
Automated	0,930	0,952	3,76

Factor Sensitivity: APTT times obtained with **APTT Coagulation** were evaluated on factor-deficient plasmas using a semi-automated coagulometer. The results are shown the following table.

Percent Factor	APTT-Clotting Times (in seconds)			
	Factor VIII	Factor IX	Factor XI	Factor XII
100%	28,4	25,7	25,8	25,9
60%	28,2	27,8	28,6	29,6
50%	28,7	28,3	30,2	31,5
40%	29,6	30,7	32,0	33,2
30%	33,5	31,1	34,3	35,1
20%	35,0	32,9	36,5	38,7
10%	41,4	36,7	42,4	45,7

These values should be used as guidelines. Each laboratory should establish factor sensitivity using their instruments, reagents and techniques.

Heparin Sensitivity: The heparin sensitivity of **APTT COAGULATION** from **Wama Diagnóstica** can be determined using normal plasma with known levels of heparin and by measuring the APTT. The following results were obtained using the **APTT COAGULATION** and a semi-automated coagulometer.

Heparin Concentration (units/ml)	APTT - Clotting Time (in seconds)
0,0	23,0
0,1	28,0
0,2	38,1
0,3	59,0
0,4	76,1
0,5	99,4

LIMITATIONS

- To prevent discrepant results ensure the blood to anticoagulant ratio is 9:1.
- Grossly lipemic, jaundiced and hemolyzed samples may produce erroneous APTT values.
- Delay in testing, difficulty in specimen collection and venipuncture above the site of a thrombus may result in falsely prolonged APTT results.
- APTT results can vary with anticoagulation therapy depending upon the type and dosage of anticoagulant, the route for administration and the time of administration of the last dose.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- Reagents for in vitro diagnostic use only.
- Do not use the reagents after the expiration date.
- Follow the instructions for use prior to testing.
- The reagents should be well mixed by inversion and sealed immediately after use.
- The samples and controls to be tested should be used simultaneously in order to maintain the same test conditions.
- Do not ingest. Avoid skin and eyes contact.
- Handle all samples as potentially infectious.
- Dispose in accordance with local regulations.
- Use Good Laboratory Practice at storing, handling and material disposal.

WAMA Diagnóstica replaces this kit since it is not beyond expiration date. The returned kit must be evaluated by Wama's technical support. The warranty will be invalid and kit will not be replace if technical support finds evidence that running, handling and storage were not properly follow ed.

ESPAÑOL

IMPORTANCIA CLÍNICA

La finalidad de la coagulación sanguínea es formar un coágulo en el local de la lesión vascular. Además de la formación del coágulo, que funciona como un tampón para evitar la hemorragia, esta acción pro-coagulante debe ser restringida al local de la lesión, o sea, no puede diseminarse por el sistema circulatorio. Así, en el momento en el que ocurre la lesión vascular, también se desencadena la acción del sistema fibrinolítico y de los inhibidores fisiológicos de la coagulación.

El modelo propuesto por Macfarlane y Davie & Ratnoff, en 1964, de la "cascada" para explicar la fisiología de la coagulación de la sangre, usado aun hoy por razones didácticas, divide la coagulación en una vía extrínseca y una vía intrínseca que convergen en el punto de activación del factor X (inicio de la vía final o común).

El TTPa evalúa la vía intrínseca de la coagulación, consecuentemente evalúa los factores VIII, IX, XI y XII, así como los factores X, V, II y I de la vía común.

El TTPa es usado para la detección de deficiencias o inhibidores de los factores de la coagulación de la vía intrínseca o común, además de ser el test de elección para monitorear la terapia de anticoagulación con heparina y para screening del anticoagulante lúpico. También es sensible a la presencia de productos de degradación de la fibrina.

Es el test indicado, junto con el TP, cuando hay crisis hemorrágicas y en las rutinas pre-operatorias.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Para que haya formación de un coágulo de fibrina por vía intrínseca de la coagulación es necesaria la presencia de los factores de coagulación I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI y XII, además de un lípido plaquetario (fosfolípido) y calcio.

El reactivo **COAGULACIÓN – TTPa** provee un fosfolípido (cefalina), ya que el plasma utilizado es pobre en plaquetas y, consecuentemente, no dispone del lípido plaquetario, un activador de contacto (ácido elálgico) y calcio (cloruro de calcio), el cual fue removido por quelación por el uso del anticoagulante citrato de sodio. Por lo tanto, cuando el reactivo TTPa (cefalina + ácido elálgico) es adicionado a un plasma normal citratado determina la activación del FXII, el cual por acción activará el FXI. A partir de ahí se toma necesaria la presencia del calcio para que la activación de los otros factores ocurra. El tiempo llevado para la formación del coágulo de fibrina después de la adición del cloruro de calcio es medido en segundos y representa el Tiempo de Tromboplastina Parcial (TTPa). El grado de prolongación del TTPa es proporcional a la concentración de heparina en el plasma.

REACTIVO COAGULACIÓN – TTPa

El reactivo **COAGULACIÓN – TTPa** de **WAMA Diagnóstica** es una preparación líquida de cefalina obtenida de carabos de conejo, ácido elálgico, tampón, estabilizadores y conservantes. El reactivo es suministrado pronto para ser usado. El cloruro de Calcio es suministrado separadamente y pronto para ser usado.

PRESENTACIÓN DEL KIT

REF 731040-C - 40 determinaciones

- Reactivo - TTPa: 1 x 4 ml
- Cloruro de Calcio (0,02M): 1 x 4 ml
- Instrucción de uso

REF 731080-C - 80 determinaciones

- Reactivo - TTPa: 2 x 4 ml
- Cloruro de Calcio (0,02M): 2 x 4 ml
- Instrucción de uso

REF 731200-C - 200 determinaciones

- Reactivo TTPa: 5 x 4 ml
- Cloruro de Calcio (0,02M): 5 x 4 ml
- Instrucción de uso

MATERIAL NECESARIO, NO SUMINISTRADO.

- Tubos plásticos para test
- Pipeta automática
- Baño María – 37°C
- Cronómetro

- Recipiente para descartar material

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Reactivo TTPa(1): Pronto para ser usado. El reactivo es estable hasta la fecha de vencimiento impresa en el rótulo, siempre que sea almacenado entre 2 a 8°C en su propio frasco.

Cloruro de Calcio (0.02M)(2): Pronto para ser usado. El reactivo es estable hasta la fecha de vencimiento impresa en el rótulo, siempre que sea almacenado entre 2 a 8°C en su propio frasco.

Obs.: El kit mantiene el mismo desempeño después del primer uso, y es estable hasta la fecha de caducidad desde que sea mantenido en la temperatura de 2-8°C.

MUESTRAS

1. Colecta de sangre con jeringa: coleccionar sangre venosa con jeringa siliconizada o plástica. Inmediatamente transferir 9 ml de sangre para un tubo conteniendo 1 ml de citrato de sodio a 3,2% o 3,8% (puede ser 4,5 de sangre para 0,5 de citrato de sodio, mantener siempre la relación de 9 partes de sangre para 1 de citrato de sodio).

2. Colecta de sangre con tubo al vacío: usar tubo al vacío conteniendo citrato de sodio a 3,2% o 3,8% (tapa azul). Asegurarse de que el tubo de colecta está completo, ya que la relación 9 partes de sangre y 1 parte de citrato de sodio es crítica. Se recomienda que la colecta se haga usándose primero un tubo sin anticoagulante (tubo seco). En caso de que la colecta sea solamente para tests de coagulación, coleccionar dos tubos con citrato de sodio y utilizar el segundo tubo para la realización de los tests. Si las colectas son múltiples, la muestra para los tests de coagulación debe ser obtenida después de la colecta de una muestra en tubo sin anticoagulante (tubo seco), siempre antes de la colecta en tubo conteniendo EDTA.

3. Preparación del plasma: Después de la colecta mezclar gentilmente por inversión la sangre y el anticoagulante, centrifugar por 15 minutos a 2.500x g (cerca de 3000rpm). Si las muestras no van a ser usadas inmediatamente, el plasma debe ser transferido para un tubo plástico. Plasmas hemolizados o conteniendo más de 10.000 plaquetas/mm³ o con hematías presentes no son recomendados para los tests de coagulación.

4. Almacenamiento del plasma: muestras de plasma pueden ser almacenadas a temperatura ambiente (18 a 26°C) hasta por 2 horas; refrigeradas (2 a 8°C) hasta por 4 horas; congeladas (-20°C) hasta por 2 meses o a -70°C hasta por 6 meses. El plasma puede ser re-centrifugado previamente al congelamiento para asegurar que todas las células sean removidas. En el momento de **testear** muestras congeladas, deben ser rápidamente descongeladas y los tests realizados inmediatamente. Las muestras almacenadas no deben entrar en contacto con vidrio y no deben ser incubadas a 37°C por más de 5 minutos para evitar la pérdida de los factores V y VII. Muestras mantenidas por más de 4 horas a temperatura ambiente prolongan el TTPa, ya que el FVIII es lábil.

PROCEDIMIENTO

Este procedimiento es para la realización manual de los tests. Para Sistemas Semi-Automáticos o Automáticos consultar el manual de instrucciones del equipamiento.

- Pre-incubar el Cloruro de Calcio (0,02M) a 37°C por, mínimo, 10 minutos.
- Pipetar 100µl del plasma a ser testado o del plasma control en un tubo plástico. Incubar a 37°C por 1 a 2 minutos.
- Pipetar 100µl del reactivo TTPa (1) en el tubo conteniendo el plasma después de homogeneizar la suspensión del reactivo por inversión.
- Incubar a 37°C por 3 minutos.

5. Pasado ese tiempo, pipetar 100µl del Cloruro de Calcio (0,02M) (2) pre-incubado, disparando simultáneamente el cronómetro.

6. Delicadamente por leves movimientos de inversión del tubo, registrar el tiempo de coagulación del plasma en segundos.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Se recomienda realizar los tests en duplicata (muestras y controles) y calcular el **tiempo promedio**. La diferencia entre los resultados de las duplicatas deben ser menores que 5%. Repetir el test si se considera necesario.

El resultado del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado es expresado en números de segundos llevados desde la adición del reactivo Cloruro de Calcio hasta la formación del coágulo de fibrina.

En el resultado se puede incluir el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado y la Relación entre el Paciente y un Control Normal (obtenido por la determinación del TTPa de un plasma o "pool" de plasma que se sabe normal).

VALORES ESPERADOS

Los resultados del TTPa son influenciados por el método de detección del coágulo de fibrina y pueden variar de un laboratorio a otro. En general, tests para TTPa con plasmas normales presentan tiempos de formación del coágulo que varían de 24 a 39 segundos cuando se realizan con coagulómetro. Sin embargo, cada laboratorio debería establecer un rango normal usando individuos de su población de pacientes. Si ocurren cambios en el método usado (manual o automático), en la técnica de colecta de sangre o en el anticoagulante usado, debería ser establecido un nuevo rango normal.

Rangos terapéuticos para monitorear terapias con anticoagulante oral varían de un laboratorio a otro. Por esto, es recomendado que cada laboratorio establezca los rangos de TTPa relevantes para su respectiva población de pacientes. La relación TTPa Paciente/TTPa Normal debe ser menor que 1,3; valores iguales o superiores significan la prolongación del Tiempo de Tromboplastina Parcial activado.

Resultados anormales obtenidos con un plasma de un paciente que no hace terapia con anticoagulante pueden indicar la deficiencia de uno o más factores de la vía extrínseca o común de la coagulación, o de la presencia de un inhibidor de alguno de los factores de estas vías. El resultado también puede ser debido a ciertas drogas y medicamentos. Procedimientos adicionales tales como la determinación TP (Tiempo de Protrombina) y estudios utilizando plasmas deficientes de factores son usualmente necesarios.

CONTROL DE CALIDAD

La confiabilidad del test debería ser monitoreada dentro de cada rutina usando plasmas controles normales y anormales, tales como los **Plasma Control Nivel 1 (COD 733001-C)**, **Plasma Control Nivel 2 (COD 733002-C)** y **Plasma Control Nivel 3 (COD 733003-C)** de **WAMA Diagnóstica**. Cada laboratorio debería establecer un rango control para determinar la variación permitida en la performance diaria de cada plasma control.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Precisión: la precisión dentro de la rutina fue evaluada usando los **Plasmas Controles Niveles 1, 2 y 3 de WAMA Diagnóstica**, usando un procedimiento manual, semi-automático (MLA Electra 900C) y uno totalmente automático (ACL-100). Los resultados son mostrados en el siguiente cuadro.

Resultados de la Precisión Intra-Rutina

Sample	Manual	MLA Electra 900C (semi-automated)	Fully automated
Level 1	3,3%	2,0%	1,2%
Level 2	1,3%	2,2%	0,6%
Level 3	4,2%	2,3%	0,8%

Correlación: estudios de correlación fueron realizados contra el reactivo TTPa del mercado usando un Coagulómetro semiautomático y uno automático. Los resultados son mostrados abajo.

Resultados de la Correlación

Instruments	Regression coefficient	Slope	Intercept
Semi-Automated	0,938	0,727	6,96
Automated	0,930	0,952	3,76

Sensibilidad a Deficiencia de Factores: los TTPAs obtenidos con el reactivo **COAGULACIÓN – TTPa** fueron evaluados con plasmas deficientes de factor usando un Coagulómetro semiautomático. Los resultados son mostrados abajo.

Percent Factor	ATTP-Clotting Times (in seconds)			
	Factor VIII	Factor IX	Factor XI	Factor XII
100%	28,4	25,7	25,8	25,9
60%	28,2	27,8	28,6	29,6
50%	28,7	28,3	30,2	31,5
40%	29,6	30,7	32,0	33,2
30%	33,5	31,1	34,3	35,1
20%	35,0	32,9	36,5	38,7
10%	41,4	36,7	42,4	45,7

Esos valores deben ser usados solamente como guías. Cada laboratorio debe establecer la sensibilidad a los diversos factores usando sus propios instrumentos, reactivos y técnicas.

Sensibilidad a Concentraciones de Heparina: la sensibilidad relativa del reactivo **COAGULACIÓN – TTPa** al anticoagulante heparina puede ser determinada usando un plasma normal con concentraciones conocidas de heparina y midiéndose el TTPa. Los resultados del cuadro fueron obtenidos usando el reactivo **COAGULACIÓN – TTPa** y un Coagulómetro semiautomático

Heparin Concentration (units/ml)	APTT - Clotting Time (in seconds)
0,0	23,0
0,1	28,0
0,2	38,1
0,3	59,0
0,4	76,1
0,5	99,4

LIMITACIONES DEL MÉTODO

1. Resultados discrepantes pueden ser prevenidos asegurándose de que la relación entre sangre y anticoagulante sea de 9:1.

2. Muestras lipémicas, ictericas y hemolisadas pueden producir errores en la determinación del TTPa.

3. Atraso en la realización del test, dificultad en la colecta de la muestra y venopunción próximas al local de aplicación de terapia con heparina pueden determinar resultados falsamente prolongados de TTPa.

4. Los resultados del TTPa pueden también variar con la terapia de anticoagulación empleada, dependiendo del tipo y dosis del anticoagulante, de la vía de administración y del tiempo de administración de la última dosis.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

1. Conjunto de reactivos solo para diagnóstico *in vitro*.

2. No usar después de la fecha de vencimiento.

3. Leer cuidadosamente las instrucciones de uso antes de realizar el test.

4. Los reactivos deben ser homogeneizados levemente por inversión y tapados inmediatamente después del uso.

5. Las muestras testeadas y los controles deben ser utilizados al mismo tiempo para mantener las mismas condiciones del test.

6. No ingerir. Evitar el contacto con la piel y con los ojos.

7. Manipular todas las muestras como si tuvieran agentes infecciosos.

8. Descarte de lo material de acuerdo con las regulaciones locales.

9. Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en la conservación, manipulación y descarte de las muestras.

TERMINO DE GARANTÍA

La WAMA Diagnóstica garantiza el cambio de este conjunto diagnostico si desde el momento que el mismo esté dentro el plazo de caducidad y sea comprobado por su accesoria técnica de que no hubieron fallos en la ejecución, manoseo y conservación de este producto. La WAMA y sus distribuidores no se responsabilizan por los fallos en el desempeño del kit bajo estas condiciones.

BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFÍA

- Arkin, CF; Adcock, DM; Ernst, DJ et al. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays: Approved Guideline – Fourth Edition*. Wayne, PA: NCCLS; 2003, NCCLS document H21-A4.
- Human Blood Coagulation, Hemostasis and Thrombosis*, 3rd ed. R Biggs, CR Rizza, Editors. Blackwell Scientific Publications, London, 1984.
- Cole E, Hall ER, Wu KK, *Principles of Antithrombotic Therapy*. In *Wu KK, Thromboembolic Disorders*, PSG Publishing Co. Inc. Itteton, 1984, p 91.
- Harker LA, *Hemostasis Manual*, FA Davis Co, Philadelphia, 1974, p 62.
- Hougie C, *The Biochemistry of Blood Coagulation, In Laboratory Evaluation of Coagulation*, American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1982, p 2.
- Karnal, AH; Telfer, A.; Pruthi, RK. How to Interpret and Pursue an Abnormal Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time, and Bleeding Time in Adults. *Mayo Clin Proc.*, 2007, 82(7): 864-873.
- Owen CA, Bowie EJM, Thompson JH. *The Diagnosis of Bleeding Disorders*, Little Brown and Company, Boston, 1975 p 110.
- Triplett DA, Harms CS, *Procedures for the Coagulation Laboratory*, American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1981, p 7.
- Triplett DA, *Heparin: Clinical use and Laboratory Monitoring*. In Triplett DA, *Laboratory Evaluation of Coagulation*, American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago, 1982, p 272.
- Young DS, Pestaner LC, Gibberman V, *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, Clin Chem, 1975, 21: 1D.

SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA

	O conteúdo é suficiente para (n) testes Quantity sufficient for (n) tests O conteúdo é suficiente para (n) testes		Número do lote Lot Number Número do lote
	Data limite de utilização Expiry Date Fecha de la caducidad		Número do catálogo Catalog Number Número del catálogo
	Produto diagnóstico <i>in vitro</i> In vitro diagnostic Produto diagnóstico <i>in vitro</i>		Limite de temperatura Temperature Limite de temperatura
	Consultar instruções para uso Refer to user's instructions Consultar las instrucciones para el uso		Proteger do calor Keep away from sunlight Proteger del calor
	Representante Europeu European Representative Representante Europeu		Fabricado por Manufactured by Fabricado por