

Tiempo de Protrombina

Finalidad . Sistema para la determinación del tiempo de protrombina (TP) y medición de los factores del complejo protrombínico (factores II, V, VII y X).

Uso Profesional.

[Solamente para uso diagnóstico in vitro.]

Principio . La tromboplastina (factor tisular, factor III) desencadena el mecanismo de coagulación de la vía extrínseca formando, con el factor VII, un complejo estequiométricamente dependiente del calcio. El factor VII es transformado en una enzima activa (factor VIIa), que actúa sobre el factor X generando el factor Xa y éste, junto con los fosfolípidos del factor tisular, el factor Va y el calcio, forman el Complejo Activador (o Convertidor) de la Protrombina, que transforma la protrombina en trombina. Ésta, por su vez, actúa sobre el fibrinógeno generando fibrina. La formación de la fibrina está macroscópicamente demostrada por la aparición de un coágulo. El TP es el tiempo necesario para la formación de fibrina después de la mezcla de tromboplastina, plasma y calcio. Los resultados se obtienen a través de la comparación entre los tiempos de coagulación del plasma de pacientes y del plasma de referencia, representando la medida de la actividad de los factores del complejo protrombínico (factores II, V, VII y X).

Característica del sistema . El reactivo *PT - Labtest* contiene tromboplastina extraída de cerebro de conejo que tiene gran sensibilidad a las deficiencias aisladas o combinadas de los factores II, factor V, factor VII y factor X, cuando se la compara con otras tromboplastinas de cerebro de conejo. Su elevada sensibilidad a la presencia de los PIVKas (Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonism), con respuestas bastante próximas de las tromboplastinas humanas, brinda una elevada confiabilidad en el control de la terapéutica anticoagulante.

Una característica importante del reactivo Labtest está relacionada a su rastreabilidad al Third International Reference Reagent for Thromboplastin (código RBT/05) de la OMS y al Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) establecido en relación al Primer Preparado de Referencia Internacional (PIR) de Tromboplastina (humana) 67/40. Así, los resultados obtenidos *con PT* resultan substancialmente equivalentes a los que se encontrarían si los TP fuesen realizados con el PIR 67/40, haciendo que los resultados sean estandarizados a nivel mundial¹.

Metodología . Coagulométrica - Quick².

Reactivo

1. **RT1** - Reactivo 1 - Almacenar entre 2 - 8 °C.

Líquido, listo por el uso. Contiene: extracto de cerebro de conejo $\geq 2,9\%$, cloruro de sodio 105-145,5 mM, citrato de sodio 25-30 mM, isotiazolinona 0,1-0,35%. Ver valor del ISI impreso en el rótulo del frasco. No congelar.

El TP Ref. 504 no abierto, almacenado en las condiciones indicadas, es estable hasta la fecha de expiración impresa en el rótulo.

Después de abierto, el reactivo es estable durante 14 días entre 2 - 8 °C.

Almacenar los reactivos al abrigo de la luz y evitar exposición prolongada a la luz ambiente.

El reactivo 1 debe calentarse en un recipiente con tapa para evitar su evaporación. La exposición prolongada al calentamiento y aire atmosférico puede comprometer su desempeño. El reactivo debe permanecer abierto solamente el tiempo necesario para obtener el volumen que pueda utilizarse en el ensayo. La estabilidad del reactivo puede ser comprometida por el uso de las puntas mal lavadas, sucias o contaminadas.

Por tratarse de una suspensión, el reactivo puede presentar sólidos sedimentados en la parte inferior del frasco. El reactivo debe ser homogeneizado suavemente hasta que todo sólido sea resuspendido y lo mismo presenta aspecto homogéneo. La no homogenización del reactivo impacta en resultados erróneos.

Precauciones y cuidados especiales

Los cuidados habituales de seguridad deben ser aplicados en la manipulación del reactivo.

Almacenar los reactivos al abrigo de la luz y evitar exposición prolongada a la luz ambiente.

Material necesario y no provisto

1. Baño-María mantenido a temperatura constante (37°C);
2. Pipetas para medir muestras y reactivo;
3. Cronómetro.

Influencias pre-analíticas . El TP puede estar aumentado en individuos que usan corticoesteroides, contraceptivos orales (fallas en la excreción de sales biliares), asparaginasa, clofibrato, eritromicina, etanol, tetraciclina, heparina y warfarina, y también en presencia de EDTA.

La reducción del TP puede observarse en individuos que usan anti-histamínicos, butobarbital, fenobarbital, anticonceptivos orales (disminución de la respuesta a los anticoagulantes orales), vitamina K y cafeína. (Ver el ítem *Modificación de la Acción de los Anticoagulantes Orales*).

Muestra

Usar plasma recogido en citrato trisódico anhidro 109 mmol/L (3,2%).

Muestras de pacientes y el plasma de referencia no deben ser diluidos para la realización de las pruebas.

Se debe crear un Procedimiento Operativo Estándar (POE) que establezca procedimientos adecuados para la toma, preparación y almacenamiento de la muestra. Destacamos que los errores debidos a la muestra pueden ser mayores que los errores ocurridos durante el procedimiento analítico.

Considerando que a calidad de la muestra es fundamental para la exactitud de los resultados, se recomienda la utilización de los procedimientos que siguen^{3,4,5}.

1. Obtener la sangre por punción venosa y evitar el agarrotamiento prolongado, la hemólisis, la formación de burbujas y la aspiración de líquido tisular (factor III). La aguja debe penetrar directamente en la vena en la primera tentativa (punción venosa no traumática). La sangre debe fluir libremente sin que sea necesario aplicar demasiada fuerza al émbolo. No realizar el TP en muestras cuya punción fuera difícil (punción venosa traumática).

2. Usar jeringa de plástico y centrifugar en tubos de plástico. El uso de material de vidrio no siliconado activa los factores de la coagulación y reduce falsamente el TP. Después de sacar la aguja, utilizar la porción central de la muestra en la jeringa, usando las porciones anterior y posterior para otros ensayos.

3. En los sistemas de recolección al vacío, usar tubo de plástico o de vidrio siliconado. Tomar 2 muestras cuando la recogida se destine solamente a ensayos de coagulación. La primera en un tubo sin anticoagulante o en un tubo que contenga citrato (tapa azul) debe ser despreciada. La segunda muestra recogida en tubo conteniendo citrato (tapa azul) debe ser utilizada para la realización de los tests. En el caso de una recolección múltiple, la muestra para los ensayos de coagulación debe ser obtenida después de la toma de muestra en tubo sin anticoagulante y antes de la recolección de un tubo que contenga EDTA.

4. Mezclar 9 partes de sangre con 1 parte de citrato o 3 mL de sangre y 1 gota de *Trombstab* (Labtest Ref. 45). Homogeneizar 3 o 4 veces por inversión suave. No usar oxalato, pues el Factor V es muy sensible a este anticoagulante.

5. En pacientes que presentan un hematocrito mayor al 55%, la relación entre los volúmenes de sangre y de anticoagulante debe ser ajustada para garantizar la exactitud del resultado. Para calcular el volumen de anticoagulante necesario en función del hematocrito y del volumen de sangre, utilizar la siguiente fórmula:

Volumen de anticoagulante (mL) = 0,00185 x volumen de sangre (mL) x (100 - hematocrito).

Ejemplo

Para un hematocrito de 60% usar 0,22 mL de citrato y completar a 3,0 mL con sangre. Para usar *Trombstab* (Labtest Ref. 45), adicionar 2 gotas a 0,5 mL de agua y usar en la proporción indicada por el cálculo.

6. Centrifugar hasta 1 huera después de la recolección a 3000 rpm o a 1500 g durante 15 minutos. No es necesario remover el plasma del tubo. Mantener el tubo tapado hasta la realización del examen para prevenir alteraciones del pH de la muestra que pueden interferir en los resultados.

7. Mantener las muestras entre 18 y 24 °C y realizar el TP hasta 4 horas después de la recolección. No refrigerar el plasma, pues puede haber activación del Factor VII por el sistema Caliceína, reduciendo falsamente el TP. En caso de que exista posibilidad de congelamiento rápido, el plasma puede ser congelado a 20°C negativos por 2 semanas o a 70 °C negativos por 6 meses.

Sugerimos congelar el material en alícuotas de 0,5 mL y, para evitar la evaporación del material durante el período de almacenamiento, utilizar frascos adecuados para congelamiento ("criotubos"). Las muestras deben ser descongeladas rápidamente a 37 °C y ensayadas inmediatamente.

8. La presencia de coágulos implica el rechazo de la muestra.

Las muestras de sangre deben ser consideradas como potencialmente infectivas. Por lo tanto, al manipularlas se deben seguir las normas establecidas para bioseguridad.

Para descartar los reactivos y el material biológico, sugerimos aplicar las normas locales, estatales o federales de protección ambiental.

Interferencias

Las muestras ictericas, lipémicas y hemolisadas pueden modificar los resultados de forma imprevisible.

Procedimiento³

El reactivo puede presentar sólidos sedimentados en la parte inferior del frasco. El reactivo debe ser homogeneizado suavemente hasta que todo sólido sea resuspension y lo mismo presenta aspecto homogéneo. La no homogenización del reactivo impacta en resultados erróneos.

El reactivo debe permanecer abierto solamente el tiempo necesario para obtener el volumen que pueda utilizarse en el ensayo. **Almacenar los reactivos al abrigo de la luz y evitar exposición prolongada a la luz ambiente.**

El reactivo puede ser empleado para la determinación del TP utilizando equipos automáticos y semi-automáticos. Se recomienda seguir exactamente las instrucciones de operación propuestas por los fabricantes.

El siguiente procedimiento se aplica a la técnica manual.

1. Preparar el plasma de referencia a través de la mezcla (pool) de plasmas citratados obtenidos de, al menos, 3 individuos sanos. No usar plasmas de portadores de enfermedades hepáticas o de mujeres embarazadas o que usan anticonceptivos orales.

Se debe obtener el tiempo del plasma de referencia para cada lote de PT. Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan mantener un registro de los lotes de PT y de los tiempos del plasma de referencia.

2. Realizar el ensayo en tubos de vidrio rigurosamente limpios.
3. La temperatura del baño-María debe estar entre 36,0 y 38,0 °C.
4. Incubar 0,1 mL del plasma a ser medido (referencia, control o paciente) como mínimo 1 minuto y como máximo 10 minutos.
5. Adicionar 0,2 mL del Reactivo 1 (previamente atemperado a 37 °C) y disparar simultáneamente el cronómetro. Mezclar suavemente y mantener en el baño-María por 9 segundos.
6. Extraer el tubo, inclinarlo constantemente a intervalos menores a 1 segundo y observar la formación de un coágulo que ocurre cuando se interrumpe el movimiento del líquido. Detener inmediatamente el cronómetro y registrar el tiempo.

Cálculos . Relación de los tiempos de Protrombina (R), Relación Normalizada Internacional (RNI) y Actividad de Protrombina (A%).

Los resultados pueden ser obtenidos en la "Tabla de Conversión en Relación (R), Relación Normalizada Internacional (RNI) y Actividad de Protrombina (A)".

Localizar en la línea "Pool de Referencia", donde los tiempos de coagulación están destacados en negrita, el valor que más se aproxima al tiempo de coagulación obtenido para el pool de referencia. Enseguida, localizar en la columna correspondiente el tiempo de coagulación de la "Muestra de Prueba".

Los resultados de la muestra de prueba, expresados en Relación (R), Relación Normalizada Internacional (RNI) y Actividad (%) pueden ser obtenidos en la misma línea que se refiere el tiempo en segundos de la muestra de prueba, en las tres últimas columnas de la tabla.

El R y RNI también pueden ser calculados usando la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{Tiempo en segundos del plasma del paciente}}{\text{Tiempo en segundos del pool de referencia.}}$$

El cálculo de la R permite estandarizar los resultados, con la eliminación de las variables introducidas por la recolección de la muestra y la ejecución metodológica.

$$RNI = R^{ISI}$$

Calibración y rastreabilidad . El PT fue calibrado con el Third International Reference Reagent for Thromboplastin (código RBT/05) de la OMS y tiene el Índice de Sensibilidad Internacional (ISI) establecido con relación al Primer Preparado de Referencia Internacional (PIR) de Tromboplastina (humana) 67/40¹.

Control interno de la calidad . El laboratorio debe mantener un programa de control interno de calidad que defina claramente: regulaciones aplicables, objetivos, procedimientos, criterios para especificaciones de calidad y límites de tolerancia, acciones correctivas y registro de las actividades.

Se deben usar materiales de control para evaluar la imprecisión y desvíos de la calibración. Se sugiere utilizar las especificaciones CLIA para el cálculo del error total⁶.

Para la realización del control interno de calidad a Labtest dispone de los controles controles Qualitrol Hemostasis 1 - Ref. 507, Qualitrol Hemostasis 2 - Ref. 508 e Qualitrol Hemostasis 1 + 2 - Ref. 509 utilizados para el control de los ensayos: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada y Fibrinógeno.

La comparación de los resultados obtenidos con PT y otros fabricantes solamente debe ser realizada utilizando la RNI.

Valores de referencia . Estos valores deben ser usados solamente como orientación. Se recomienda que cada laboratorio establezca, en la población atendida, su propio rango de valores de referencia.

Actividad de Protrombina: mayor a 70%. Valores por encima de 100% no tienen significado patológico debiendo ser informados como 100%.

La RNI en personas sanas se encuentra entre 1,0 y 1,08.

Control de la terapéutica anticoagulante . La utilización de la RNI está especialmente indicada para establecer el rango terapéutico en los pacientes que usan anticoagulantes orales. La tabla de abajo indica los resultados a obtener en las diversas indicaciones terapéuticas⁷:

Indicación Terapéutica

Anticoagulación pre y post-operatoria (iniciada con antelación de 2 semanas):	RNI	
	Objetivo	Variación
Cirugías de costillas	2,5	2,0 - 3,0
Otras cirugías	2,0	1,5 - 2,5
Prevención de trombosis venosa primaria o secundaria	2,5	2,0 - 3,0
Trombosis venosa activa, embolia pulmonar, prevención de trombosis venosa recurrente	3,0	2,0 - 4,0
Prevención de trombo-embolia arterial y portadores de válvulas cardíacas mecánicas	3,5	3,0 - 4,5

Una RNI mayor a 5,0 está asociada a riesgo elevado de hemorragia.

Según la OMS¹, todos los resultados, independientemente de la finalidad del ensayo, deben ser informados en términos de actividad y de la RNI y todos los profesionales relacionados con el uso de anticoagulantes orales deben ser inducidos a utilizar la RNI y abandonar la actividad de protrombina como un proceso de evaluación del grado de anticoagulación.

Modificación de la acción de los anticoagulantes orales . La acción de los anticoagulantes orales puede ser modificada por medicamentos y por alteraciones fisiológicas de la siguiente manera:

Potenciando la acción . Fenilbutazona, indometacina, clofibrato, salicilatos, ácido etacrínico, ácido nalidixico, D-tiroxina, probenidica, sulfas y antibióticos, difenilhidantoína, tobutamida, butazonas, inhibidores de la MAO, feniramido, metilfenidato, disulfiran, PAS,

noretandrolona, quinina, quinidina, dipirona, paracetamol, propiltiouracil, glucagon y drogas hepatotóxicas.

disturbio de la absorción intestinal, antibioticoterapia, insuficiencia hepática, fibrinólisis y coagulación intravascular.

Reduciendo la acción . Barbitúricos (excepto tiobarbitúricos), meprobamatos, griseofulvín, estrógenos y anticonceptivos orales, diuréticos, aceites minerales, colestiramina, e irritantes de la mucosa gastrointestinal.

Observaciones

1. La limpieza y secado adecuados del material utilizado son factores fundamentales para la estabilidad de los reactivos y obtención de resultados correctos.

2. El laboratorio clínico tiene como objetivo fornecer resultados exactos y precisos. La utilización del agua de calidad inadecuada es causa potencial de errores analíticos. El agua desionizada o destilada utilizadas en el laboratorio deben tener la cualidad adecuada a cada aplicación. Así, para preparar reactivos, usar en las mediciones, y para el uso en enjuágalo final de las vidrierías, deben tener resistividad ≥ 1 megaohm.cm o conductividad ≤ 1 microsiemen/cm y concentración de silicatos $< 0,1$ mg/l (agua tipo II). Cuando la columna desionizadora está con su capacidad saturada produce agua alcalina con liberación de varios iones silicatos y substancias con gran poder de oxidación o reducción que deterioran los reactivos en pocos días o incluso horas, alterando los resultados de modo imprevisible. Por ello es fundamental establecer un programa de control de la calidad del agua.

Características de desempeño¹⁰

Estudios de comparación . El método propuesto fue comparado con un método similar, obteniéndose los siguientes resultados:

	Método Comparativo	Método Labtest
Número de muestras	40	40
Tiempo de protrombina (segundos)	12,1 - 41,7	11,7 - 40,3
Media de las estimativas (segundos)	24,5	24,0
Relación normalizado internacional	0,91 - 4,01	0,94 - 4,06
Ecuación de regresión*	Método Labtest = 1,056 x Método Comparativo - 0,037	
Coefficiente de correlación	0,993	

Utilizando la ecuación de regresión, el error sistemático total estimado en la RNI de 1,0 es igual a 2,0%, en la RNI 2,5 es igual a 4,2%.

Estudios de precisión . Los siguientes resultados fueron obtenidos en los estudios de precisión:

Repetitividad - Imprecisión intra-ensayo

	n	Media (RNI)	DP	CV (%)
Muestra 1	20	1,0	0,01	1,31
Muestra 2	20	2,3	0,03	1,35

Reproducibilidad - Imprecisión total

	n	Media (RNI)	DP	CV (%)
Muestra 1	20	1,0	0,02	1,56
Muestra 2	20	2,5	0,05	1,96



Evaluación del error total . El error total (error aleatorio + error sistemático) estimado en RNI de 1,0 es igual a 5,0% y en la RNI de 2,5 es igual a 8,0%. Los resultados indican que el método cumple con la especificación CLIA para el error total ($\leq 15,0\%$)⁶.

Significado clínico . El TP está prolongado en todos los casos de deficiencias congénitas o adquiridas de los factores II, V, VII y X. Las deficiencias adquiridas se dan principalmente en: tratamiento con anticoagulantes orales, disturbios de la ingestión o absorción de vitamina K, enfermedad hemorrágica del recién-nacido, ictericia obstructiva,

Referencias

- WHO Expert Committee on Biological Standardization. *48th Report. WHO Tech Rep Ser* 1999; 889:70-95.
- Quick AJ, Leu M. *J Biol Chem* 1937;119:73-84.
- International Committee for Standardization in Hematology. *Thromb Haemostas* 1976;36:237-238.
- CLSI. Transport, and processing of blood specimens for testing plasma based coagulation assays and molecular hemostasis assay: Approved guide line. 5th ed. CLSI document H21-A5, 2008.
- NCCLS. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Fifth Edition*. NCCLS document H3-A5, 2003.
- CLIA *Requirements for Analytical Quality*. Disponible en <http://www.westgard.com/clia.htm>.
- Loeliger EA, Poller L, Samama E et al. *Thromb Haemostas* 1985;54:515-517.
- Henrykopf F, Rosenfeld LGM, Guerra CCC. *Rev Ass Méd Brás* 1977;23:100-102.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization. *33rd Report. WHO Tech Rep Ser* 1983;687:81-105.
- Labtest: Datos de archivo.

Presentación

Producto	Referencia	Contenido
PT	504/5-2	 5 X 2 mL
	504/5-4	 5 X 4 mL

Informaciones al consumidor

[Términos y Condiciones de Garantía]

Labtest Diagnóstica garantiza el desempeño de este producto, dentro de las especificaciones, hasta la fecha de expiración indicada en los rótulos, siempre que los cuidados de utilización y almacenamiento indicados en los rótulos y en estas instrucciones, sean seguidos correctamente.



Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000

Lagoa Santa . Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Customer Service | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)

e-mail: customerservice@labtest.com.br

Edición: Mayo, 2016

Ref.: 071117

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.

Reproducción bajo previa autorización

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with ivd devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Tóxico Tóxico Poison
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Reagente Reactivo Reagent
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control
	Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control
	Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Periodo após abertura Periodo post-abertura Period after-opening		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before		

Ref.: 140214 |