

Quantitative determination of Activated Partial Thromboplastin Test (APTT) IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

When phospholipids complex and calcium chloride (CaCl₂) are added to citrated plasma, the factors of intrinsic coagulation system are activated; the time to formation of a fibrin clot is then measured^{3,4}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

The time measurement of APTT is the most common coagulation procedure performed in routine laboratories, apart from the PT. The APTT is particularly sensitive to defects of the intrinsic coagulation pathway (Factors VIII, IX, XI, XII). It is commonly used for monitoring heparin anticoagulant therapy^{1,2}. Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1 Activator	Ellagic acid Buffers and preservatives
R 2 Starter	Calcium chloride (CaCl ₂) 0.02M
Optional	CONTROL NORMAL REF: 1709104 CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

PREPARATION

All the reagents are ready to use.

R1: Stable for 1 month at 2-8°C after opening.

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.

A yellow sediment may form after prolonged storage.

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^(Note 1).

SAMPLES

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

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

Centrifuge the sample at 2500 x g for 15 min and transfer the plasma into a 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 28 days if immediately frozen at below -20°C.

PROCEDURE

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

MANUAL METHOD

1. Incubate at 37°C the reagents and the sample:
2. Mix thoroughly the reagents.
3. Pipette into a clean and dry tube:

Citrated plasma (µL)	100
R 1 (µL)	100

4. Mix and incubate exactly for 5 min. at 37°C (activation time).

5. Pipette:

R 2 (µL)	100
----------	-----

6. Mix thoroughly.

7. On addition of R2 start stopwatch or timer on the coagulation analyzer and determine the coagulation time.

CALCULATIONS

It is possible to report the results as seconds or as APTT ratio, dividing the results of the sample (sec) by the results of plasma Control (sec).

$$APTT \text{ ratio} = \frac{APTT \text{ of the patient in seconds}}{APTT \text{ of normal plasma (pool \%) in seconds}}$$

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

An exhaustive study has been run with 250 samples of healthy people, and as a result it has been established the following reference values:

APTT (in seconds) 24 - 36 sec.

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS
Heparin Sensitivity:

Heparin conc. (units/mL)	APTT (sec)
0.0	28.8
0.1	38.3
0.2	50.1
0.3	63.1
0.4	80.9
0.5	98.0

Factor Sensitivity:

Adequate sensitivity should demonstrate < 30-40% factor activity.

Factor	% actividad	APTT (sec)	% Factor VIII	APTT (sec)
VIII	<1%	82.0	100%	32.5
VIII	20%	44.8	70%	34.0
IX	<1%	83.5	50%	36.9
IX	20%	40.9	40%	38.9
XI	<1%	134.2	30%	40.8
XI	20%	47.8	20%	44.4
XII	<1%	>200	10%	50.6
XII	20%	36.2	5%	56.1
Prekallikrein	<1%	69.5	1%	68.1
			<1%	83.6

These values should only be used as guidelines. Each laboratory should establish his own sensitivity to individual factors.

INTERFERENCES

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

Oral contraceptives, estrogens or pregnancy interfere in the assay.

A list of drugs and other interfering substances with the determination has been reported^{5,6}.

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 AACC 1999.
2. Arkin C et al. One stage PT and APTT; Approved Guideline vol 16 n° 3 NCCLS 96.
3. Brandt A et al: Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments in the APTT. Amer.J Clin. Path . 76:530,1981.
4. Wujastyk, J., Triplett D.A.: Selecting Instrumentation and Reagents for the Coagulation Laboratory. Pathologist 37:398 (1983).
5. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
6. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.

PACKAGING

Ref: 1709201

Cont.

R1 5 x 4 mL

R2 5 x 4 mL

Determinación cuantitativa del Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (APTT) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

 Los factores intrínsecos de la coagulación se activan en presencia de un complejo fosfolipídico y un activador soluble en plasma citratado; se mide el tiempo transcurrido después de la adición del cloruro cálcico (CaCl₂) hasta la formación del coágulo de fibrina^{3,4}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La medida del tiempo de APTT, es la determinación más común junto con la PT, sirve para determinar trastornos de la coagulación y es particularmente sensible a los defectos de la coagulación intrínseca (Factores VIII, IX, XI, XII).

 Se usa normalmente para la monitorización de las terapias anticoagulantes con heparina^{1,2}.

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

REACTIVOS

R 1 Activador	Ácido elálgico Tampón y conservantes.
R 2 Iniciador	Cloruro cálcico (CaCl ₂) 0.02M
Opcional	CONTROL NORMAL REF: 1709104 CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

PREPARACION

Los reactivos están listos para su uso.

R1: Una vez abierto es estable 1 mes a 2-8°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.

Después de un almacenamiento prolongado puede aparecer un sedimento amarillo.

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^(Nota 1).

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 2500 x g 15 min y transferir el plasma.

Usar solo 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 28 días si se congela inmediatamente a -20°C.

PROCEDIMIENTO

 El reactivo puede emplearse en técnica manual, mecánica, foto-óptica o con cualquier instrumento apto para detectar la formación del coágulo^(Nota 2).

TÉCNICA MANUAL

1. Calentar a 37°C los reactivos y la muestra.
2. Mezclar bien los reactivos sin agitarlos.
3. Pipetear en un tubo de ensayo limpio y seco:

Plasma citratado (µL)	100
R1 (µL)	100

4. Mezclar bien e incubar exactamente 5 min. a 37°C (tiempo de activación).

5. Pipetear:

R 2 (µL)	100
----------	-----

6. Mezclar

7. Poner en marcha el cronómetro o el controlador de tiempo del coagulómetro y medir el tiempo de formación del coágulo, a partir de la adición del R2 Iniciador.

CÁLCULOS

Los valores se pueden expresar en segundos o en tasa de APTT, dividiendo el resultado de la muestra (sec) por el tiempo de reacción del plasma Control (sec).

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

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 o 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

Se ha realizado un estudio exhaustivo con 250 muestras de una población sana y como resultado se han establecido los valores de referencia siguientes:

APTT (segundos) 24 - 36 sec.

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

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO
Sensibilidad frente a la heparina:

Heparina conc. (unid/mL)	APTT (sec)
0,0	28,8
0,1	38,3
0,2	50,1
0,3	63,1
0,4	80,9
0,5	98,0

Sensibilidad frente a los factores de coagulación:

Se considera una adecuada sensibilidad un factor de actividad ≤ 30-40%.

Factor	% actividad	APTT (sec)	% Factor VIII	APTT (sec)
VIII	<1%	82,0	100%	32,5
VIII	20%	44,8	70%	34,0
IX	<1%	83,5	50%	36,9
IX	20%	40,9	40%	38,9
XI	<1%	134,2	30%	40,8
XI	20%	47,8	20%	44,4
XII	<1%	>200	10%	50,6
XII	20%	36,2	5%	56,1
Prekallikrein	<1%	69,5	1%	68,1
			<1%	83,6

Estos valores deben ser usados solo como referencia. Cada laboratorio debe establecer sus propio índice de sensibilidad a los factores individuales.

INTERFERENCIAS

No usar como anticoagulante oxalato sódico, EDTA o heparina.

Anticonceptivos orales, estrógenos o embarazo pueden influir en los resultados.

 Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en su determinación^{5,6}.

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 AACCC 1999.
2. Arkin C et al. *One stage PT and APTT; Approved Guideline vol 16 n° 3 NCCLS 96.*
3. Brandt A et al: *Laboratory Monitoring of Heparin. Effect of Reagents and Instruments in the APTT.* *Amer.J Clin. Path.* 76:530,1981.
4. Wujastyk, J., Triplett D.A.: *Selecting Instrumentation and Reagents for the Coagulation Laboratory.* *Pathologist* 37:398 (1983).
5. Young DS. *Effects of drugs on Clinical Lab. Tests*, 4th ed AACCC Press, 1995.
6. Young DS. *Effects of disease on Clinical Lab. Tests*, 4th ed AACCC 2001.

PRESENTACION

Ref: 1709201	Cont.	R1 5 x 4 mL R2 5 x 4 mL
--------------	-------	----------------------------