HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Protamine Response Test (PRT)

Package Insert
English

INTENDED USE
The HEMOCHRON® PRT is designed for *in vitro* diagnostic protamine dose *Response* evaluation. The HEMOCHRON PRT200 peach top and the PRT400 red top test tubes are recommended for use in invasive cardiology procedures requiring protamine for neutralization of heparin anticoagulation. The kaolin-activated PRT assays may also be used for patients receiving aprotinin. The PRT200 and PRT400 should be used with established HEMOCHRON procedural guidelines with HEMOCHRON models 401, 801, 8000 and *Response*.

For *in vitro* Diagnostic Use

SUMMARY AND EXPLANATION
The dose of protamine sulfate required to neutralize heparin after cardiopulmonary bypass surgery is commonly based on a ratio of protamine to the amount of heparin infused during the procedure[1-3], or on protamine titration.[3,4] Protocols for performing protamine titration have evolved because of the need to determine protamine dosages more accurately than can be derived based solely on empirical considerations.

Accurate determination of protamine dose is advantageous in view of the known complications associated with excess or insufficient protamine.[5-8] Too low a dose may result in heparin-related bleeding and may require additional protamine. Too high a dose of protamine may result in increased evidence of protamine toxicity. Of equal clinical significance is the observation that the heparin neutralizing potency of protamine varies depending on the manufacturer and lot number.[9] Management of the coagulation state of the cardiopulmonary bypass surgery patient is optimized when these protamine variables are controlled.

The purpose of protamine titration is to determine the exact protamine dosage required to completely neutralize circulating heparin in any given patient. Protamine titration involves performing a clotting time on a heparinized blood sample to which a known amount of protamine has been added. *In vitro* protamine neutralization of heparin correlates with the in vivo effects of protamine.[10, 11]

Protamine Response Test
The PRT may be run in conjunction with the injectable protamine sulfate supplied by the individual hospital pharmacy. Studies have shown that using the RxDx system gives optimum results and improved clinical outcomes.[12, 13, 14]

Data show that running the PRT in this manner allows accurate prediction of the in vivo *Response* to protamine from an *in vitro* assay.[15]

The PRT200 and PRT400 tests are available with either Celite® (diatomaceous earth) or kaolin activators. The Celite-activated PRT test is not intended for use with the protease inhibitor aprotinin (Trasylol®, Bayer Corporation), which may be administered to reduce post-operative bleeding, especially during cardiopulmonary bypass surgery, and can prolong the Celite-activated PRT. Kaolin is unaffected by moderate doses of aprotinin. The kaolin-activated PRT can be used for protamine dose *Response* evaluation in patients whether or not they are receiving aprotinin.

The PRT is performed using HEMOCHRON Whole Blood Coagulation instrument models 401, 801, 8000 or *Response*. The PRT contains the reagents required to perform an Activated Clotting Time (ACT) plus an appropriate concentration of protamine. The PRT200 contains 20 µg/mL of protamine, a concentration that corresponds to an average protamine dosage required to neutralize heparin at the end of bypass surgery. The PRT400 contains 40 µg/mL protamine for use in cases requiring large amounts of heparin.

In 1975, Bull et al.[11] published the dose *Response* curve method, based on the ACT, to individualize heparin and protamine dosages. A method of protamine titration using the HEMOCHRON to automate the performance of the ACT was described in 1983.[4] The PRT is based on the dose *Response* curve principle. Two milliliters (2 mL) of patient whole blood are used to perform a status ACT and a PRT which contains 0.04 mg or 0.08 mg. (depending on tube type) of protamine. A protamine *Response* curve is constructed for the individual patient. Using these results and patient data[16], the dosage of protamine in mg required to neutralize the circulating heparin is determined. The infusion dose is calculated automatically by the HEMOCHRON *Response* (software version 2.0 or greater) or 8000, or manually using the worksheet provided.

Heparin neutralization can be verified by performing an ACT and PDAO (orange top). See the PDAO package insert for details of this procedure.

REAGENTS
The HEMOCHRON PRT test tubes are intended for use with fresh whole blood. The test tubes contain a lyophilized preparation of protamine sulfate with added activator, stabilizers and buffers. The PRT200 and PRT400 test tubes are provided with color coded stoppers.

- Each R-PRT200 tube (peach top) contains protamine sulfate (0.04 mg), diatomaceous earth, stabilizers and buffers.
- Each R-PRT200K tube (peach top) contains protamine sulfate (0.04 mg), kaolin, stabilizers and buffers.
- Each R-PRT400 tube (red top) contains protamine sulfate (0.08 mg), diatomaceous earth, stabilizers and buffers.
- Each R-PRT400K tube (red top) contains protamine sulfate (0.08 mg), kaolin, stabilizers and buffers.

STORAGE AND STABILITY
The HEMOCHRON PRT tubes should be stored at controlled room temperature (15 - 30°C). The PRT tubes are stable until the marked expiration date. Avoid prolonged exposure of the PRT kits to temperatures exceeding 30°C.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING
Materials Provided
- PRT200 Test tube (peach top; Celite or kaolin-activated, as appropriate).
- PRT400 Test tube (red top; Celite or kaolin-activated, as appropriate).
- PRT worksheet (for manual calculations, if required).

Materials Required
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 or two 401s.
- Non-siliconized, non-heparinized 5 mL syringes for blood specimen collection.
- #20 gauge or larger straight needle for transfer of the blood specimen into the test tube.
- ACT test tube: FTCA510 (black top) or FTK-ACT (gold top), as appropriate.

CAUTION: Every precaution should be taken to use proper technique with syringes to avoid accidental needlestick.

For blood collection, adhere to the appropriate technique (A or B):
A. Indwelling venous or arterial blood line. (Do not obtain blood from a heparinized access line or indwelling heparin lock.)
1. Discontinue fluids drip, if required.
2. Using a two syringe technique, draw two 5 mL syringes and discard the first syringe.
B. Extracorporeal blood line port.
1. Flush the extracorporeal blood access line by withdrawing and discarding 5 mL of blood.
2. Draw 5 mL whole blood into a 5 mL syringe.

TEST PROCEDURE
If using the HEMOCHRON *Response* (software version 2.0 or higher) or 8000, the system software will quantify the protamine dose based on PRT200 or PRT400 test results and information supplied by the user, along with the status ACT results.

If using the HEMOCHRON *Response* (software version below 2.0), 401, 801 and the PRT calculation worksheet, use the following guideline to determine which PRT tube to use:

PRT 200 (Peach top): Patient's estimated circulating heparin level at the time of reversal is under 6.5 units/mL.

PRT 400 (Red top): -Patient's estimated circulating heparin level at the time of reversal is greater than or equal to 6.5 units/mL.

NOTE: While this guideline is appropriate for most patients, in cases where excessive doses are calculated, repeat testing with the alternative tube may yield a more accurate dose estimation.

If using Celite-activated PRT tests, an FTCA510 (black top) ACT should be used. If using kaolin-activated PRT, an FTK-ACT (gold top) should be used.

Recommended Protocol
1. Prior to heparin neutralization of the patient, obtain the baseline ACT.
2. Once rewarming of the patient has begun, simultaneously perform a PRT test and a status ACT. From the collection syringe, dispense exactly 2.0 mL of blood into the PRT test tube. At the same time, depress the START button of the appropriate HEMOCHRON test well.
3. Immediately agitate the test tube vigorously from end to end ten times.
4. Insert the PRT test tube into the appropriate test well. Quickly rotate the tube clockwise. See the appropriate instrument operator manual for additional information.
5. From the same collection syringe, dispense exactly 2.0 mL of blood into the ACT tube. At the same time, depress the START button of the appropriate HEMOCHRON test well.
6. Immediately agitate the test tube vigorously from end to end ten times.
7. Insert the ACT test tube into the appropriate HEMOCHRON test well. Quickly rotate the tube clockwise. See the appropriate instrument operator manual for additional information.
8. At the indicator tone, record the test result.
9. Determine the protamine infusion dose. See Dose Calculations below.

Dose Calculations
If using the HEMOCHRON *Response* (software version 2.0 or higher), refer to the HEMOCHRON *Response* RxDx Operator Manual for detailed instructions on the use of this automated calculation system. If using the HEMOCHRON 8000, follow instructions in this instrument's operator manual. If using the HEMOCHRON *Response* with software versions below 2.0, HEMOCHRON 401 or 801, follow instructions on the PRT worksheet provided in this kit to calculate the protamine dose.

Calculating Circulating Heparin Intra-procedurally
This can be done using the HEMOCHRON *Response* (software version 2.0 or higher) or 8000. Perform a PRT and status ACT. As with any other *in vitro* test procedure, the PRT results should never supersede the clinical judgment of the attending physician.

PRODUCT USE WARNING
NOTE: Observe universal precautions at all times.
1. The blood specimen should be transferred using an appropriate transfer needle to pierce the stopper.
2. Always use a two-hand technique to transfer blood. One hand securely holds the tube while the second hand dispenses the blood specimen from the syringe.
3. The PRT test tubes are made of glass. They can be broken or cracked if mishandled. Do not drop or toss tubes.
4. The PRT test tubes contain a particulate activator (Celite or kaolin) as well as a material of biological origin (protamine sulfate). Do not handle the material, aerosol, or ingest.
5. All used test tubes containing human derived blood should be discarded in approved biohazard containers.
6. Do not remove stoppers to deliver a blood sample to the tube.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS
The PRT result is an indication of the circulating heparin level of the individual patient. Lower PRT values indicate the need for less protamine to neutralize the heparin in the patient's bloodstream. Published clinical reports have shown that the PRT recommended protamine dose is frequently 15% to 40% lower than a standard empirical dose (1 mg protamine/100 units heparin given).[12-15]

Precision
Reproducibility was determined using HEMOCHRON Quality Control for PRT.

	Level 1				Level 2			
R-PRT200	Day 1	Day 2	Day 3	Combined	Day 1	Day 2	Day 3	Combined
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Mean	138	135	141	138	360	360	362	360
Std dev	2.5	2.3	4.0	3.7	6.1	2.1	7.6	5.1
CV%	1.8	1.7	2.9	2.7	1.7	0.6	2.1	1.4
R-PRT200K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Mean	131	138	139	136	313	317	321	317
Std dev	2.5	8.5	5.1	6.5	2.3	2.0	3.6	4.3
CV%	1.9	6.2	3.7	4.8	0.7	0.6	1.1	1.4
R-PRT400	Day 1	Day 2	Day 3	Combined	Day 1	Day 2	Day 3	Combined
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Mean	154	158	140	151	405	412	401	406
Std dev	6.1	2.6	2.1	9.1	8.5	10.4	3.2	8.3
CV%	4.0	1.7	1.5	6.0	2.1	2.5	0.8	2.0
R-PRT400K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Mean	141	142	155	146	336	340	333	336
Std dev	2.1	7.6	5.0	3.7	9.0	12.7	8.5	9.3
CV%	1.5	5.4	3.2	2.7	2.7	3.7	2.6	2.8

Kaolin-activated dosing results in cardiac surgery patients treated with aprotinin
Clinical data were collected at two sites following institutional approval. Dosing calculations at each site were performed manually by the perfusionist running the assays.

The efficacy of the PRT predicted doses is summarized in the table below. The percentage of patients given the dose as quantified by the kaolin PRT tests is shown under the heading "Dosed as recommended".

Protamine Dosing

Site	# Patients	Dosed as recommended #	(%)	Target ACT	Pts Reaching Target #	(%)	Heparin Dose (x 1000IU) mean ± SD	Range
1	77	76	(99)	120	74	(97)	Not reported	
2	42	39	(86)	Baseline	30	(84)	194.4 ± 56.3	95 – 420

These data reflect dosing efficacy of the kaolin system in the presence of aprotinin. Wide dose ranges are expected in a population study due to the individual patient's heparin sensitivity, length of procedure, and total heparin dose given throughout the procedure.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE
1. The accuracy of the protamine dose prediction is dependent upon the accuracy of the patient's calculated blood volume. In some instances, blood volume changes during surgery may be dramatic due to excessive intravenous-fluid infusion, urinary loss, blood loss, and blood component transfusion. As with any medication by infusion, the user must be aware of these alterations because of their potential effects on the efficacy of the protamine infusion.
2. The use of additional heparin or heparinized blood products (i.e., salvaged red blood cells from the extracorporeal system) following the performance of the PRT assay will negate the test results and protamine prediction. In this circumstance, the PRT assay should be repeated to reflect the additional protamine requirements. The post-surgical patient should be monitored with the ACT and PDAO to determine the need to infuse additional protamine to compensate for latent heparin effect, which may possibly result in heparin rebound.[17] Should the addition of protamine fail to restore the baseline ACT, an acquired coagulopathy should be suspected. The performance of an ACT and PDAO will demonstrate the presence or absence of heparin and confirm whether additional protamine will aid in restoration of the baseline ACT.
3. The heparin resistant patient requires large quantities of heparin to prolong the ACT. It is possible that, if heparin concentrations are extremely high, plotting the status ACT and the PRT to determine the protamine *Response* will result in a "flat curve". Should this occur, an "Out of Range" message will be indicated on the HEMOCHRON Model 8000 and a recommended dose will not be shown for the PRT. A preliminary conservative empirical dose of protamine is recommended in such circumstances. After neutralizing a percentage of the heparin with an initial dose, the PRT and status ACT can be repeated to calculate the appropriate dose to effectively neutralize the remaining circulating heparin.
4. Only kaolin-activated (R-PRT200K or R-PRT400K) tubes should be used for patients receiving aprotinin. Studies have not been performed utilizing other antifibrinolytic agents.
5. *In vitro* analyses have indicated an elevation of the PRT predicted dose at aprotinin concentrations exceeding 500 KIU/mL blood when using the kaolin-activated system.[15]
6. Test results which do not agree with expected values should be verified and thereafter evaluated by alternative diagnostic means.

QUALITY CONTROL (QC)
Routine quality control testing and tracking should be a part of a comprehensive quality assurance program. HEMOCHRON Whole Blood Coagulation System Quality Control products are available to make routine QC convenient and affordable.

Daily QC of the Instrument
HEMOCHRON instruments should be quality controlled at two levels of control once every 8 hours of operation. To assist in accomplishing daily QC, Electronic System Verification Tubes are available and can provide multiple level (normal and abnormal) quality control checks on the instrument. A Temperature Verification Tube is also provided for use every 6 months to verify that the instrument is maintaining the proper temperature 37°C ± 1°C. Any errors found in the temperature controls system will also be displayed on the LCD screen by the instrument.

QC of HEMOCHRON Test Tubes
Each box of HEMOCHRON test tubes should be validated at least once prior to use. This can be accomplished by using the appropriate HEMOCHRON Liquid Quality Control. Acceptable performance ranges for the test tubes are included with each HEMOCHRON Quality Control Product Kit. After each individual box of test tubes has been verified, the "Performance Verified" table provided on the side panel of each test tube box should be completed. This box is now "IN CONTROL" and will not require further liquid quality control unless a shift in clinical results is experienced.

NOTE: If multiple boxes are received within the same shipment, it is recommended to validate each box prior to use.

REFERENCES

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass. J Extra-Corporeal Tech 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration. J Extra-Corporeal Tech 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay: A comparison of two methods. AMSECT Proceedings, March 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass. Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin. J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes. J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamine: A review of its toxicity. Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test. J Extra Corporeal Tech 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose. J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II. The use of a dose-*Response* curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using *in vitro* heparin and protamine dosing assays. Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, May 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery: The *in vitro* effect of aprotinin. J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery: Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods. Perfusion 14: 181-7, 1999.

	L1	L2	X̄	r
EN	Level 1	Level 2	Mean	Range
FR	Niveau 1	Niveau 2	Moyenne	Plage
DE	Level 1	Level 2	Durchschnitt	Bereich
IT	Livello 1	Livello 2	Media	Intervallo
ES	Nivel 1	Nivel 2	Media	Intervalo
PT	Nível 1	Nível 2	Media	Limite
NL	Niveau 1	Niveau 2	Gemiddelde	Bereik
DK	Niveau 1	Niveau 2	Gennemsnit	Område

ITC
8 Olsen Avenue • Edison, NJ 08820 USA
tel: 732.548.5700 • fax: 732.248.1928
www.itcmed.com
a subsidiary of Thoratec Corporation

HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Protamin-Reaktionsnachweis (PRT)

Packungsbeilage
Deutsch

VORGESEHENE VERWENDUNG
Der HEMOCHRON® PRT wurde für die Protamindosis-Reaktions-auswertung in der In-vitro-Diagnostik entwickelt. Die Reagenzgläser des HEMOCHRON PRT200 mit pfirsichfarbenem Ende und die des PRT400 mit rotem Ende werden für die Verwendung bei invasiven kardiologischen Verfahren empfohlen, die Protamin zur Neutralisation der Heparin-Gerinnungshemmung erfordern. Die Kaolin-aktivierten PRT-Analysen können auch bei Patienten, die Aprotonin erhalten, angewandt werden. Der PRT200 und der PRT400 sollten entsprechend den anerkannten HEMOCHRON-Verfahrensrichtlinien mit HEMOCHRON-Produktmodellen 401, 801, 8000 und *Response* angewandt werden.

Zur *In-Vitro*-Diagnose

ÜBERBLICK UND ERLÄUTERUNG
Die für die nach kardiopulmonaler Bypass-Operation erforderliche Protaminsulfat-Dosis zur Neutralisierung von Heparin basiert üblicherweise auf dem Verhältnis von Protamin zu der während des Verfahrens infundierten Menge Heparin[1-3] oder auf Protamin-Titrierung.[3,4] Wegen der Notwendigkeit, Protamin-Mengen exakter zu bestimmen als dies allein basierend auf empirischen Prüfungen erzielt werden kann, wurden Protokolle für die Durchführung von Protamin-Titrierung entwickelt.

Die exakte Ermittlung von Protamindosen ist vorteilhaft im Hinblick auf bekannte Komplikationen im Zusammenhang mit übermäßigem oder unzureichendem Protamin.[5-8] Eine zu geringe Dosis kann in Heparin-bezogener Blutung resultieren und zusätzliches Protamin erfordern. Eine zu hohe Protaminmenge kann zu erhöhter Protamin-Toxizität führen. Gleiche klinische Relevanz kommt der Beobachtung, dass die Heparin-Neutralisierungsfähigkeit von Protamin abhängig von Hersteller und Charge-Nummer variiert, zu. Das Management des Gerinnungsstatus bei Patienten nach kardiopulmonaler Bypass-Operation wird optimiert, wenn diese Protamin-Veränderungen kontrolliert werden.

Die Protamin-Titrierung wird zwecks Ermittlung der exakten, für die völlige Neutralisierung zirkulierenden Heparins erforderliche Protaminmenge bei jedem individuellen Patienten durchgeführt. In die Protamin-Titrierung eingebunden ist die Ermittlung der Gerinnungszeit an einer heparinisierten Blutprobe, der eine bekannte Menge Protamin hinzugefügt wurde. In-vitro-Protamin-Neutralisierung von Heparin korreliert mit den In-vivo-Effekten von Protamin.[10,11]

Protamin-Reaktionsnachweis
Der PRT kann zusammen mit dem durch die individuelle Klinik-Apotheke bereitgestellten, injizierbaren Protaminsulfat laufen. Studien haben gezeigt, dass die Verwendung des RxDx-Systems optimale Ergebnisse erbringt und die klinischen Resultate verbesserte.[12, 13, 14]

Aus den Daten wird ersichtlich, dass der Durchlauf des PRT auf diese Weise eine exakte Vorhersage der In-vivo-Reaktion auf Protamin aus einer In-vitro-Analyse erlaubt.

Die PRT200- und PRT400-Tests sind entweder mit Celite® (Diatomeenerde) oder Kaolin-Aktivatoren erhältlich. Der Celite-aktivierte PRT-Test ist nicht für die Verwendung mit dem Protease-Inhibitor Aprotonin (Trasylol®, Bayer Corporation) vorgesehen, welcher verabreicht werden kann, um postoperative Blutungen zu reduzieren, insbesondere während kardiopulmonaler Bypass-Operationen; hierdurch kann eine Prolongation des Celite-aktivierten PRT bewirkt werden. Kaolin wird durch eine moderate Menge Aprotonin nicht beeinflusst. Der Kaolin-aktivierte PRT kann zur Protamindosis-Reaktionsauswertung angewandt werden - unabhängig davon, ob die Patienten Aprotonin erhalten oder nicht.

Der PRT wird unter Verwendung der HEMOCHRON Vollblutgerinnung-Instrumentenmodelle 401, 801, 8000 oder *Response* durchgeführt. Der PRT enthält die für die Durchführung einer aktivierten Gerinnungszeit (ACT) erforderlichen Reagenzien sowie eine entsprechende Konzentration von Protamin. Der PRT200 enthält 20µg/mL Protamin – eine Konzentration, die der durchschnittlichen für die Neutralisierung von Heparin am Ende einer Bypass-Operation erforderlichen Protaminmenge entspricht Der PRT400 enthält 40 µg/mL Protamin zur Verwendung bei Fällen, die große Mengen Heparin erfordern.

Im Jahr 1975 veröffentlichten Bull et al.[11] die Mengenreaktionskurven-Methode, basierend auf der ACT, um die Heparin- und Protamin-Mengen zu individualisieren. Eine Methode der Protamin-Titrierung unter Verwendung des HEMOCHRON zur Automatisierung der Durchführung der ACT wurde in 1983 [4] beschrieben. Der PRT basiert auf dem Mengenreaktionskurven-Prinzip. Zwei Milliliter (2 mL) Patienten-Vollblut werden verwendet, um eine Status-ACT und einen PRT, der (abhängig vom Typ des Reagenzglases) 0,04 mg oder 0,08 mg Protamin enthält, durchzuführen. Für jeden einzelnen Patienten wird eine Protaminreaktionskurve erstellt. Die für die Neutralisierung des zirkulierenden Heparins erforderliche Menge Protamin wird unter Verwendung dieser Ergebnisse und Patientendaten16 in Milligramm ermittelt. Die Infusionsmenge wird automatisch von der HEMOCHRON *Response* (Software-Version 2.0 oder höher) oder vom Modell 8000 berechnet, beziehungsweise manuell unter Verwendung der zur Verfügung stehenden Arbeitsblätter.

Heparin-Neutralisierung kann mittels Durchführung einer ACT und PDAO (orangefarbene Kappe) verifiziert werden. Details dieses Verfahrens entnehmen Sie bitte der PDAO-Packungsbeilage.

REAGENZIEN
Die HEMOCHRON PRT-Reagenzgläser sind für die Verwendung mit frischem Vollblut vorgesehen. Die Reagenzgläser enthalten eine lypohilisierte Aufbereitung von Protaminsulfat mit hinzugefügtem Aktivator, Stabilisatoren und Puffern. Die Reagenzgläser des PRT200 und des PRT400 sind mit farbkodierten Stopfen erhältlich.

- Jedes R-PRT200-Reagenzglas (pfirsichfarbene Kappe) enthält Protaminsulfat (0,04 mg), Diatomeenerde, Stabilisatoren und Puffer.
- Jedes R-PRT200K-Reagenzglas (pfirsichfarbene Kappe) enthält Protaminsulfat (0,04 mg), Kaolin, Stabilisatoren und Puffer.
- Jedes R-PRT400-Reagenzglas (rote Kappe) enthält Protaminsulfat (0,08 mg), Diatomeenerde, Stabilisatoren und Puffer.
- Jedes R-PRT200K-Reagenzglas (rote Kappe) enthält Protaminsulfat (0,08 mg), Kaolin, Stabilisatoren und Puffer.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT
Die HEMOCHRON PRT-Reagenzgläser sollten bei kontrollierter Raumtemperatur (15 – 30°C) gelagert werden. Die PRT-Reagenzgläser sind bis zu dem angegebenen Verfallsdatum haltbar. Setzen Sie die PRT-Kits nicht längerfristig 30°C übersteigenden Temperaturen aus.

PROBENSAMMLUNG UND -HANDHABUNG
Zur Verfügung stehende Materialien
- PRT200-Reagenzglas (pfirsichfarbenes Ende; Celite- oder Kaolin-aktiviert, entsprechend der Erfordernis).
- PRT400-Reagenzglas (rote Kappe; Celite- oder Kaolin-aktiviert, entsprechend der Erfordernis).
- PRT-Arbeitsblatt (für die manuelle Berechnung, sofern benötigt).

Erforderliche Materialien
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 oder zwei 401s.
- Nicht silicierte, nicht heparinisierte 5-mL-Spritzen für Blutprobensammlung.
- Gerade Nadel der Stärke #20 oder größer für das Einbringen der Blutprobe in das Reagenzglas.
- ACT-Reagenzglas: FTCA510 (schwarze Kappe) oder FTK-ACT (goldene Kappe), entsprechend der Erfordernis.

ACHTUNG: Zur Vermeidung versehentlicher Nadelstichverletzungen sollten durch korrekt angewandte Technik im Umgang mit Spritzen bestmögliche Vorkehrungen getroffen werden.

Halten Sie sich bei der BlutsammLung an die entsprechende Technik (A oder B):
A. Venöser oder arterieller Blut-Verweilkatheter. (Entnehmen Sie kein Blut aus einem heparinisierten Zugangskatheter oder einer liegenden Heparin-Sperre.)
1. Unterbrechen Sie die Tropfinfusion erforderlichenfalls.
2. Entnehmen Sie bei der Anwendung der Zwei-Spritzen-Technik zwei 5-mL-Spritzen voll und werfen Sie die erste Spritze weg.
B. Extrakorporaler Katheterzugang.
1. Spülen Sie den extrakorporalen Blutzugangskatheter durch Abziehen und Entsorgen von 5 mL Blut.
2. Ziehen Sie 5 mL Vollblut in einer 5-mL-Spritze auf.

TESTVERFAHREN
Bei Einsatz der HEMOCHRON *Response* (Software-Version 2.0 oder höher) oder des Modells 8000, quantifiziert die Systemsoftware die Protaminmenge basierend auf PRT200- oder PRT400-Testergebnissen und durch den Benutzer bereitgestellte Informationen, zusammen mit den Status-ACT-Ergebnissen.

Stellen Sie bei Einsatz der HEMOCHRON *Response* (Software-Version niedriger als 2.0), 401, 801 sowie des PRT-Berechnungs-Arbeitsblattes anhand der folgenden Richtlinie fest, welches PRT-Reagenzglas zu verwenden ist:

PRT 200 (pfirsichfarbene Kappe): Der geschätzte zirkulierende Heparinspiegel des Patienten liegt zum Zeitpunkt des Rückschlags unter 6,5 Einheiten/mL.

PRT 400 (rotes Ende): Der geschätzte zirkulierende Heparinspiegel des Patienten zum Zeitpunkt des Rückschlags beträgt 6,5 Einheiten/mL oder liegt darüber.

ANMERKUNG: Wenngleich diese Richtlinie für die meisten Patienten anwendbar ist, kann in Fällen mit errechneter überhöhter Menge die Wiederholung des Tests mit dem alternativen Reagenzglas eine genauere Mengenschätzung ergeben.

Bei der Verwendung Celite-aktivierter PRT-Tests sollte eine FTCA510 (schwarze Kappe) ACT eingesetzt werden. Bei der Verwendung Kaolin-aktivierter PRT sollte eine FTK-ACT (goldene Kappe) eingesetzt werden.

Empfohlenes Protokoll
1. Ermitteln Sie vor der Heparin-Neutralisierung des Patienten die Ausgangs-ACT.
2. Führen Sie, nachdem mit der Wiederaufwärmung des Patienten begonnen wurde, gleichzeitig einen PRT-Test und eine Status-ACT durch. Geben Sie aus der Sammelspritze genau 2,0 mL Blut in das PRT-Reagenzglas. Drücken Sie zur selben Zeit den START-Knopf der entsprechenden HEMOCHRON-Testquelle herunter.
3. Schütteln Sie sofort das Test-Reagenzglas 10-mal kräftig von einem Ende zum anderen.
4. Setzen Sie das PRT-Test-Reagenzglas in die entsprechende Testquelle. Drehen Sie das Test-Reagenzglas schnell im Uhrzeigersinn. Zusätzliche Informationen finden Sie im entsprechenden Instrumenten-Bedienungshandbuch.
5. Geben Sie aus derselben Sammelspritze genau 2,0 mL Blut in das ACT-Reagenzglas. Drücken Sie zur selben Zeit den START-Knopf der entsprechenden HEMOCHRON-Testquelle herunter.
6. Schütteln Sie sofort das Test-Reagenzglas 10-mal kräftig von einem Ende zum anderen.
7. Setzen Sie das ACT-Test-Reagenzglas in die entsprechende HEMOCHRON-Testquelle. Drehen Sie das Test-Reagenzglas schnell im Uhrzeigersinn. Zusätzliche Informationen finden Sie im entsprechenden Instrumenten-Bedienungshandbuch.
8. Zeichnen Sie bei Erklingen des Indikatortons die Ergebnisse auf.
9. Ermitteln Sie die Protamin-Infusionsmenge. Siehe nachstehende Mengenberechnung.

Mengenberechnungen
Ziehen Sie bei Verwendung des HEMOCHRON *Response* (Software-Version 2.0 oder höher) für detaillierte Gebrauchsanweisungen dieses automatischen Berechnungssystems das HEMOCHRON *Response* RxDx-Bedienungshandbuch heran. Befolgen Sie bei Verwendung des HEMOCHRON 8000 die Anweisungen in diesem Instrumenten-Bedienungshandbuch. Befolgen Sie bei Verwendung des HEMOCHRON *Response* mit niedrigeren Software-Versionen als 2.0, HEMOCHRON 401 oder 801 die Anweisungen auf dem diesem Kit beigelegten PRT-Arbeitsblatt zur Berechnung der Protaminmenge.

Intraprozedurale Berechnung zirkulierenden Heparins
Diese kann unter Verwendung der HEMOCHRON *Response* (Software-Version 2.0 oder höher) oder 8000 vorgenommen werden. Führen Sie einen PRT und eine Status-ACT durch. Wie bei jedem anderen In-vitro-Testverfahren sollten die PRT-Ergebnisse niemals die klinische Beurteilung durch den anwesenden Arzt ersetzen.

WARNHINWEIS ZUR VERWENDUNG DES PRODUKTS
BEACHTEN SIE BITTE: Halten Sie stets allgemeine Vorsichtsmaßnahmen ein.
1. Die Blutproben sollten mittels einer entsprechenden Transfernadel zum Durchstechen des Stopfens eingebracht werden.
2. Wenden Sie bei Bluttransfer immer die Zwei-Hand-Technik an. Eine Hand hält das Reagenzglas sicher fest, während die zweite Hand die Blutprobe aus der Spritze ausgibt.
3. Die PRT-Test-Reagenzgläser sind aus Glas hergestellt. Sie können bei falscher Behandlung zerbrochen werden oder zerspringen. Lassen Sie die Reagenzgläser nicht fallen und werfen sie diese nicht.
4. Die PRT-Test-Reagenzgläser enthalten einen bestimmten Aktivator (Celite oder Kaolin) ebenso wie Material biologischen Ursprungs (Protaminsulfat). Berühren Sie das Material / Aerosol nicht und nehmen Sie es nicht ein.
5. Alle benutzten Test-Reagenzgläser, die menschliches Blut enthalten, sollten in übliche Container für gefährliche biologische Stoffe entsorgt werden.
6. Entfernen Sie für das Einbringen der Blutprobe in das Reagenzglas nicht den Stopfen.

ARBEITSKENNLINIEN
Das PRT-Ergebnis ist ein Indikator für den zirkulierenden Heparinspiegel des einzelnen Patienten. Niedrigere PRT-Werte zeigen an, dass weniger Protamin zur Neutralisierung des Heparins im Blutstrom des Patienten benötigt wird. Veröffentlichte klinische Berichte haben gezeigt, dass die durch das PRT vorgegebene Protaminmenge häufig um 15 % bis zu 40 % niedriger ist als eine empirische Standardmenge (1 mg Protamin / 100 Einheiten verabreichten Heparins).[12-15]

Präzision
Die Reproduzierbarkeit wurde per HEMOCHRON Qualitätskontrolle für PRT nachgewiesen.

	Stufe 1				Stufe 2			
R-PRT200	Tag 1	Tag 2	Tag 3	kombiniert	Tag 1	Tag 2	Tag 3	kombiniert
Anz.	3	3	3	9	3	3	3	9
Mittelw.	138	135	141	138	360	360	362	360
Std dev	2.5	2.3	4.0	3.7	6.1	2.1	7.6	5.1
CV%	1.8	1.7	2.9	2.7	1.7	0.6	2.1	1.4
R-PRT200K								
Anz.	3	3	3	9	3	3	3	9
Mittelw.	131	138	139	136	313	317	321	317
Std dev	2.5	8.5	5.1	6.5	2.3	2.0	3.6	4.3
CV%	1.9	6.2	3.7	4.8	0.7	0.6	1.1	1.4
R-PRT400	Tag 1	Tag 2	Tag 3	kombiniert	Tag 1	Tag 2	Tag 3	kombiniert
Anz.	3	3	3	9	3	3	3	9
Mittelw.	154	158	140	151	405	412	401	406
Std dev	6.1	2.6	2.1	9.1	8.5	10.4	3.2	8.3
CV%	4.0	1.7	1.5	6.0	2.1	2.5	0.8	2.0
R-PRT400K								
Anz.	3	3	3	9	3	3	3	9
Mittelw.	141	142	155	146	336	340	333	336
Std dev	2.1	7.6	5.0	3.7	9.0	12.7	8.5	9.3
CV%	1.5	5.4	3.2	2.7	2.7	3.7	2.6	2.8

Ergebnisse der Kaolin-aktivierten Dosierung bei mit Aprotonin behandelten Herzchirurgie-Patienten.
Nach Genehmigung durch die jeweilige Einrichtung wurden an zwei Standorten Daten gesammelt. Mengenberechnungen wurden an jedem Standort manuell vorgenommen, indem der perfundierende Arzt die Analysen durchführte.

Die Effektivität der durch PRT vorausberechneten Mengen ist in untenstehender Tabelle zusammengefasst. Der prozentuale Anteil an Patienten, denen die durch den Kaolin-PRT-Test quantifizierte Dosis verabreicht wurde, ist unter der Überschrift „Dosiert wie empfohlen" aufgeführt.

Protamin-Dosierung

Standort	# Patienten	Dosiert wie empfohlen #	(%)	Ziel-ACT	Pat. Ziel Erreichend #	(%)	Heparinmenge (X 1000 IU) mittelw ± SD	Bereich
1	77	76	(99)	120	74	(97)	Nicht ausgewiesen	
2	42	39	(86)	Ausgangsbasis	30	(84)	194,4 ± 56,3	95 – 620

Diese Daten weisen die Dosierungseffektivität des Kaolin-Systems bei Vorhandensein von Aprotonin nach. Aufgrund der individuellen Heparin-Sensibilität von Patienten, der Dauer des Verfahrens und der im Verlauf des Verfahrens verabreichten Gesamtdosis an Heparin werden im Rahmen einer Bevölkerungsstudie weit auseinanderweichende Dosisbereiche erwartet.

GRENZEN DES VERFAHRENS
1. Die Genauigkeit der Vorhersage der Protaminmenge hängt von der Genauigkeit des berechneten Blutvolumens eines Patienten ab. In manchen Fällen kann sich das Blutvolumen während des operativen Eingriffes aufgrund übermäßiger intravenöser Flüssigkeitsinfusion, Urinverlust, Blutverlust und Transfusion von Blutbestandteilen dramatisch verändern. Wie bei jeder durch Infusion verabreichten Medikation muss der Anwender sich dieser Veränderungen und ihrer potentiellen Auswirkungen auf die Effektivität der Protamin-Infusion bewusst sein.
2. Die Gabe zusätzlichen Heparins oder heparinisierter Blutprodukte (z. B. rückgewonnener roter Blutkörperchen aus dem extrakorporalen System) im Anschluss an die Durchführung der PRT-Analyse wird die Testergebnisse und Protamin-Voraussage negieren. In dieser Situation sollte die PRT-Analyse wiederholt werden, um zusätzlichen Protamin-Bedarf zu berücksichtigen. Der postoperative Patient sollte mittels der ACT und PDAO überwacht werden, um über die Erfordernis der Infusion zusätzlichen Protamins zur Kompensation latenter Heparin-Effekte, die möglicherweise in Heparin-Rebound resultieren können, zu entscheiden.[17] Falls die Wiederherstellung der Ausgangs-ACT durch Zugabe von Protamin fehlschlägt, sollte von einer erworbenen Koagulopathie ausgegangen werden. Mittels der Durchführung einer ACT und PDAO lässt sich das Vorhandensein oder das Fehlen von Heparin nachweisen und somit bestätigen, ob zusätzliches Protamin bei der Wiederherstellung der Ausgangs-ACT behilflich sein wird.
3. Der heparinresistente Patient benötigt große Mengen an Heparin, um die ACT zu prolongieren. Wenn die Heparin-Konzentrationen extrem hoch sind, kann es vorkommen, dass das Plotten der Status-ACT und des PRT zur Ermittlung der Protamin-Reaktion in einer „flachen Kurve" resultiert. Sollte dies eintreten, wird auf dem HEMOCHRON Modell 8000 eine Meldung "Out of Range" (Außerhalb des Messbereichs) ausgegeben und es wird keine empfohlene Menge für den PRT gezeigt. In solchen Situationen wird eine vorläufige konservative empirische Menge an Protamin empfohlen. Nach der Neutralisierung eines prozentualen Anteils an Heparin mit einer Anfangsdosis können PRT und Status-ACT wiederholt werden, um die erforderliche Menge zur effektiven Neutralisierung des verbliebenen zirkulierenden Heparins zu errechnen.
4. Für Patienten, die Aprotonin erhalten, sollten nur Kaolin-aktivierte (R-PRT200K oder R-PRT400K) Reagenzgläser verwendet werden. Die Studien wurden nicht unter Verwendung anderer antifibrinolytischer Wirkstoffe durchgeführt.
5. Bei Verwendung des Kaolin-aktivierten Systems haben In-vitro-Analysen eine Erhöhung der vom PRT vorausberechneten Menge Aprotonin gezeigt, die 500 KIU pro Milliliter Blut übersteigen.[15]
6. Testergebnisse, die nicht mit den erwarteten Werten kongruieren, sollten verifiziert und anschließend durch alternative diagnostische Maßnahmen evaluiert werden.

QUALITÄTSKONTROLLE (QC)
Routinemäßige Qualitätskontrolle durch Tests und Überwachung sollten Bestandteil eines umfassenden Qualitätssicherungsprogramms sein. HEMOCHRON Vollblutkoagulationssystem-Qualitätskontrollprodukte stehen zur Verfügung, um Routine-QC komfortabel und bezahlbar zu machen.

Tägliche QC des Instruments
HEMOCHRON-Instrumente sollten auf zwei Kontrollebenen einmal pro 8 Stunden Betrieb auf Qualität kontrolliert werden Zur Unterstützung bei der Ausführung der täglichen QC sind Verifizierungs-Reagenzgläser für elektronische Systeme erhältlich. Diese können Qualitätskontrollprüfungen an Instrumenten auf mehreren Ebenen (normal und abnormal) leisten. Des weiteren ist ein Temperaturverifizierungs-Reagenzglas zur Anwendung alle 6 Monate erhältlich, um zu verifizieren, dass das Instrument die richtige Temperatur von 37°C ± 1°C aufrechterhält. Alle im Temperaturkontrollsystem vorgefundenen Abweichungen werden vom Instrument auch auf dem LCD-Bildschirm angezeigt.

QC von HEMOCHRON Test-Reagenzgläsern
Jede Schachtel mit HEMOCHRON Test-Reagenzgläsern sollte vor Gebrauch mindestens einmal validiert werden. Dies kann durch Verwendung der entsprechenden HEMOCHRON Flüssigkeits-Qualitätskontrolle erreicht werden. Akzeptable Leistungsbereiche für die Test-Reagenzgläser sind jedem HEMOCHRON Qualitätskontrollprodukt-Kit beigelegt. Nachdem jede einzelne Schachtel mit Test-Reagenzgläsern verifiziert wurde, sollte die Tabelle „Performance verifiziert", die sich auf der Seitenwand jeder Schachtel mit Test-Reagenzgläsern befindet, ausgefüllt werden. Diese Schachtel ist nun „UNTER KONTROLLE" und wird keine weitere Flüssigkeits-Qualitätskontrolle benötigen, es sei denn, es tritt eine Veränderung klinischer Ergebnisse auf.

ANMERKUNG: Wenn mit einer Lieferung mehrere Schachteln empfangen werden, ist es ratsam, jede Schachtel vor Gebrauch zu validieren.

QUELLENANGABE

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass (Heparin-Rückschlag bei Kindern im Anschluss an kardiopulmonalen Bypass). J Extra-Corporeal Tech (Extrakorporale Technik) 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration (Eine einfache individualisierte Methode für die dosis-reagible Heparin- und Protamin-Verabreichung). J Extra-Corporeal Tech (Extrakorporale Technik) 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay (Demonstration von Heparin-Rückschlag mit Verabreichung von Protamin unter Verwendung einer automatisierten Potaminmengenanalyse): A comparison of two methods (Ein Vergleich zweier Methoden). AMSECT Proceedings, March 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass (Protamin-Titrierung nach kardiopulmonalem Bypass). Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin (Kardiovaskuläre Auswirkungen von Protaminsulfat sind abhängig vom Vorhandensein und Typ zirkulierenden Heparins). J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes (Protamin-induzierte zirkulatorische Veränderungen). J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamin: A review of its toxicity (Eine Überprüfung dessen Toxizität). Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis (Protamin-induzierte tödliche Anaphylaxie). J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test (Neutralisierung von Heparin unter Verwendung einer Protamin-Titrierungs-Analyse und des aktivierten Gerinnungszeit-Tests). J Extra Corporeal Tech (Extrakorporale Technik) 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose (Neutralisierung von Heparin in vivo mit Protamin; Eine einfache Methode zur Schätzung der erforderlichen Dosis). J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II (Heparin-Therapie während extrakorporaler Zirkulation II). The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage (Die Anwendung einer Dosis-Reaktions-Kurve zur Individualisierung der Heparin- und Protamin-Dosierung). J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using *in vitro* heparin and protamine dosing assays (Verbessertes postoperatives Management nach kardiopulmonalem Bypass unter Anwendung der In-vitro-Heparin- und –Protamin-Dosierungs-Analyse). Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, May 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch (Heparin-Protamin-Inkongruenz). A controllable factor in bleeding after open heart surgery (Ein kontrollierbarer Faktor bei Blutung nach offener Herzchirurgie). Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations (Erhöhte Sorgfalt und Präzision von Heparin- und Protamin-Dosierung reduziert Blutverlust und Transfusion bei Patienten, die sich einer primären Herzoperation unterziehen). J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery (Vergleich von auf Celite Kaolin basierenden Heparin- und Protamin-Doesierungsanalysen während Herzoperationen): The *in vitro* effect of aprotinin (Der In-vitro-Effekt von Aprotonin). J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height (Vorherberechnung von Blutvolumen und Adipositas beim Menschen aus Körpergewicht und dritter Potenz der Körpergröße). Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery (Beurteilung der Heparin-Neutralisierung nach Herzoperation): Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods (Sensibilität auf Thrombinzeit basierender Analysen versus Protamin-Titrationsmethoden). Perfusion 14: 181-7, 1999.

HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Test de Réponse à la Protamine (PRT)

Notice du produit
Français

UTILISATION PREVUE
Le kit HEMOCHRON® PRT est conçu pour une évaluation diagnostique *in vitro* de la réponse à des doses de protamine. Les tubes à essais à capuchon pêche PRT200 et à capuchon rouge PRT400 HEMOCHRON sont recommandés durant des interventions chirurgicales cardiologiques effractives nécessitant la protamine pour neutraliser l'anticoagulation par l'héparine. Les titrages PRT au kaolin activé peuvent également être utilisés pour les patients recevant de l'aprotinine. Les PRT200 et PRT400 doivent être utilisés avec les directives sur les modalitésHEMOCHRON à suivre avec les modèles HEMOCHRON 401, 801, 8000 et *Response*.

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

SOMMAIRE ET EXPLICATIO
La dose de sulfate de protamine nécessaire pour neutraliser l'héparine après chirurgie avec circulation extracorporelle est d'habitude basée sur un rapport entre la protamine et la quantité d'héparine perfusée durant l'intervention [1-3], ou sur le titrage de la protamine [3,4]. Les protocoles pour réaliser le titrage de la protamine ont évolué en raison de la nécessité de déterminer la posologie de la protamine avec plus d'exactitude qu'on ne peut le faire en ne se basant que sur des considérations empiriques.

Une détermination exacte des doses de protamine présente des avantages dans le cadre des complications connues et associées à l'excès ou à l'insuffisance de protamine.[5-8] De trop faibles doses peuvent engendrer une hémorragieassociée à l'héparine et peuvent nécessiter un supplément de protamine. Des doses trop importantes peuvent apporter des preuves supplémentaires de la toxicité de la protamine. D'une égale importance clinique est l'observation que le potentiel neutralisant de l'héparine de la protamine varie en fonction du fabricant et du numéro de lot.[9] La gestion de l'état de coagulation d'un patient opéré avec circulation extracorporelle est optimisée quand les variables relatives à la protamine sont contrôlées.

Le but du titrage de la protamine est de déterminer la posologie exacte de celle-ci qui est nécessaire pour neutraliser complètement l'héparine en circulation chez n'importe quel patient. Le titrage de la protamine implique la réalisation de l'épreuve d'estimation du temps de coagulation sur un échantillon de sang hépariné auquel une quantité connue de protamine a été ajoutée. La neutralisation *in vitro* de l'héparine par la protamine est en corrélation avec les effets in vivo de la protamine.[10, 11]

Test de Réponse à la Protamine
Le PRT peut être effectué conjointement avec le sulfate de protamine injectable fourni par les pharmacies hospitalières individuelles. Des études ont montré que l'utilisation du système RxDx donne des résultats optimaux et améliore les dénouements cliniques.[12, 13, 14]

Les données indiquent qu'effectuer le PRT de cette manière permet une estimation exacte de la réponse in vivo à la protamine à partir d'un dosage *in vitro*.[15]

Les tests PRT200 et PRT400 sont disponibles avec des activateurs, soit Celite® (terre d'infusoires), soit kaolin. Le test PRT activé par la terre d'infusoires n'a pas comme but d'être utilisé avec de l'aprotinine, inhibiteur de la protéase (Trasylol®, Bayer Corporation), qui peut être administrée pour réduire l'hémorragie post-opératoire, particulièrement durant une intervention avec circulation extracorporelle et qui peut prolonger le PRT activé par laterre d'infusoires. Le kaolin n'est pas affecté par des doses modérées d'aprotinine. Le PRT activé par le kaolin peut être utilisé pour une estimation de la réponse des patients à une dose de protamine, qu'ils aient reçus ou non de l'aprotinine.

Le PRT est réalisé en utilisant les modèles d'instruments de coagulation de sang total HEMOCHRON 401, 801, 8000 ou *Response*. Le PRT contient les réactifs nécessaires pour réaliser une épreuve de détermination du Temps de Coagulation Activée (ACT, plus une détermination de la concentration appropriée de la protamine. Le PRT200 contient 20 µg/mL de protamine, une concentration qui correspond à la posologie moyenne de la protamine requise pour neutraliser l'héparine à la fin d'une intervention de pontage. Le PRT400 contient 40 µg/mL de protamine, pour un usage dans les cas requérant d'importantes quantités d'héparine.

En 1975, Bull et coll.[11] ont publié la méthode de la courbe de réponse aux doses, basée sur l'ACT, afin d'individualiser les posologies de l'héparine et de la protamine Une méthode de titrage de la protamine, qui utilise l'HEMOCHRON pour automatiser le résultat de l'ACT, a été décrite en 1983.[4] Le PRT repose sur le principe de la courbe de réponse aux doses. Deux millilitres (2 mL) de sang complet du patient sont utilisés pour déterminer l'ACT et un PRT contenant 0,04 mg ou 0,08 mg (en fonction du type de tube) de protamine. Une courbe de réponse à la protamine est tracée pour chaque patient. En utilisant ces résultats et les données relatives au patient16, la posologie de la protamine en mg nécessaire pour neutraliser l'héparine en circulation est déterminée. La dose à perfuser est automatiquement calculée par le modèle HEMOCHRON *Response* (version du logiciel 2.0 ou ultérieure) ou 8000, ou bien manuellement en utilisant les feuilles de travail fournies.

La neutralisation de l'héparine peut être vérifiée en déterminant l'ACT et un PDAO (capuchon orange). Se reporter à la notice du PDAO pour des renseignements au sujet de cette procédure.

REACTIFS
Les tubes à essais du kit HEMOCHRON PRT sont conçus pour être utilisés avec du sang complet frais. Les tubes à essais contiennent une préparation lyophilisée de sulfate de protamine, à laquelle ont été ajoutés un activateur, des stabilisateurs et des tampons. Les tubes à essais des kits PRT200 et PRT400 sont fournis avec des capuchons avec code couleur.

- Chaque tube du kit R-PRT200 (capuchon pêche) contient du sulfate de protamine (0,04 mg), de la terre d'infusoires, des stabilisateurs et des tampons.
- Chaque tube du kit R-PRT200K (capuchon pêche) contient du sulfate de protamine (0,04 mg), du kaolin, des stabilisateurs et des tampons.
- Chaque tube du kit R-PRT400 (capuchon rouge) contient du sulfate de protamine (0,08 mg), de la terre d'infusoires, des stabilisateurs et des tampons.
- Chaque tube du kit R-PRT400K (capuchon rouge) contient du sulfate de protamine (0,08 mg), du kaolin, des stabilisateurs et des tampons.

CONSERVATION ET STABILITE
Les tubes du kit HEMOCHRON PRT doivent être conservés à température ambiante contrôlée (15 – 30°C). Les tubes du kit PRT restent stables jusqu'à la date de péremption marquée. Éviter une exposition prolongée des kits PRT à des températures dépassant 30°C.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS
Matériel fourni
- Tube à essai PRT200 (capuchon pêche ; activé par de la terre d'infusoires ou du kaolin, selon le cas).
- Tube à essai PRT400 (capuchon rouge ; activé par de la terre d'infusoires ou du kaolin, selon le cas).
- Feuille de travail (pour les calculs manuels, si nécessaire).

Matériel requi
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 ou deux 401.
- Seringues de 5 mL nonhéparinées, non siliconées, pour la collecte d'échantillons sanguins.
- Une aiguille droite de calibre 20 ou plus large pour transférer l'échantillon sanguin dans le tube à essai.
- Un tube à essai pour ACT : FTCA510 (capuchon noir) ou FTK-ACT (capuchon or), selon le cas.

ATTENTION ! Toutes les précautions doivent être prises pour utiliser la technique qui convient avec les seringues afin d'éviter de se piquer accidentellement avec l'aiguille.

Pour la collecte du sang, suivre la technique qui convient (A ou B) :
A Tubulure à demeure pour sang veineux ou artériel. (Ne pas obtenir de sang à partir d'une tubulure d'accès héparinée ou un dispositif verrouillable à demeure pour l'héparine).
1. Arrêter la perfusion des fluides, si nécessaire.
2. En utilisant une technique à deux seringues, remplir deux seringues de 5 mL puis mettre au rebut la première seringue.
B. Orifice de tubulure de la circulation extracorporelle
1. Rincer la tubulure d'accès à la circulation extra-corporelle en prélevant et en jetant 5 mL de sang.
2. Prélever 5 mL de sang complet dans une seringue de 5 mL.

PROCÉDURE DU TEST
Si on utilise le kit HEMOCHRON *Response* (version du logiciel 2.0 ou ultérieure) ou 8000, le logiciel quantifiera la dose de protamine en fonction des résultats au test PRT200 ou PRT400 et des renseignements fournis par l'utilisateur, ainsi que les résultats de la détermination de l'ACT.

Si on utilise le kit HEMOCHRON *Response* (version du logiciel antérieure à la version 2.0), 401, 801 et la feuille de travailPRT, suivre les recommandations suivantes pour déterminer quel tube PRT doit être utilisé :

PRT 200 (capuchon pêche) : La concentration estimée de l'héparine en circulation chez le patient au moment de l'inversion est inférieure à 6,5 unités/mL.

PRT 400 (capuchon rouge) : - La concentration estimée de l'héparine en circulation chez le patient au moment de l'inversion est ultérieure ou égale à 6,5 unités/mL.

REMARQUE : Bien que cette directive soit appropriée à la plupart des patients, dans les cas où des doses excessives sont calculées, répéter le test avec l'autre tube peut aboutir à une estimation de la dose plus exacte.

Si on utilise les kits PRT activés par de la terre d'infusoires, un FTCA510 ACT (capuchon noir) doit être utilisé. Si on utilise les kits PRT activés par le kaolin, un FTK-ACT (capuchon or) doit être utilisé.

Protocole recommandé
1. Avant la neutralisation de l'héparine chez le patient, obtenir l'ACT initial..
2. Une fois que le réchauffage du patient a commencé, réaliser simultanément un test PRT et une détermination de l'ACT. A partir de la seringue de collecte, disposer exactement 2,0 mL de sang dans le tube à essai PRT. En même temps, appuyer sur le bouton START de la cupule test appropriée de l' HEMOCHRON.
3. Agiter immédiatement et vigoureusement le tube à essai en le retournant une dizaine de fois.
4. Insérer le tube à essai du kit PRT dans la cupule test appropriée. Faire tourner rapidement le tube dans le sens des aiguilles d'une montre. Se reporter au manuel de l'utilisateur de l'instrument approprié pour des renseignements supplémentaires.
5. A partir de la même seringue de collecte, disposer exactement 2,0 mL de sang dans le tube à essai ACT. En même temps, appuyer sur le bouton START de la cupule test appropriée de l' HEMOCHRON.
6. Agiter immédiatement et vigoureusement le tube à essai en le retournant une dizaine de fois.
7. Insérer le tube à essai ACT dans la cupule test appropriée de l' HEMOCHRON. Faire tourner rapidement le tube dans le sens des aiguilles d'une montre. Se reporter au manuel de l'utilisateur de l'instrument approprié pour des renseignements supplémentaires.
8. Quand l'indicateur sonore retentit, noter le résultat du test.
9. Calculer la dose de protamine à perfuser. Se reporter à la rubrique ≤Calculs des doses≤ ci-dessous.

Calculs des doses
Si on utilise l' HEMOCHRON Respone (version du logiciel 2.0 ou ultérieure), se reporter au Manuel de l'utilisateur de l'HEMOCHRON *Response* RxDx pour des instructions détaillées au sujet de l'utilisation de ce système de calcul automatisé. Si on utilise l'HEMOCHRON 8000, suivre les instructions données dans ce manuel de l'utilisateur de l'instrument. Si on utilise l' HEMOCHRON *Response* avec des versions du logiciel inférieures à la version 2.0, l'HEMOCHRON 401 ou 801, suivre les instructions fournies sur la feuille de travail PRT présente dans ce kit pour calculer la dose de protamine.

Calcul de l'héparine en circulation durant l'intervention chirurgicale
Ceci peut être réalisé en utilisant l' HEMOCHRON *Response* (version du logiciel 2.0 ou ultérieure) ou 8000. Réaliser un PRT et une détermination de l'ACT. Comme pour toute autre procédure de test *in vitro*, les résultats PRT ne doivent jamais remplacer le jugement clinique du médecin traitant.

MISE EN GARDE CONCERNANT L'USAGE DU PRODUIT
REMARQUE : Suivre les précautions universelles à tout moment.
1. L'échantillon sanguin doit être transféré en utilisant une seringue de transfert appropriée pour percer le bouchon.
2. Toujours utiliser la technique à deux mains pour transférer le sang. Une main maintient fermement le tube tandis que la seconde main verse l'échantillon sanguin contenu dans la seringue.
3. Les tubes à essai PRT sont en verre. Ils peuvent être cassés ou fissurés en cas de mauvaise manipulation. Ne pas tomber ou lancer les tubes.
4. Les tubes à essai PRT contiennent un activateur particulaire (terre d'infusoires ou kaolin), ainsi qu'un produit d'origine animale (sulfate de protamine). Ne pas manipuler le produit, le vaporiser ou l'ingérer.
5. Tous les tubes à essai usagés contenant du sang humain doivent être mis au rebut dans des contenants pour objets contaminés approuvés.
6. Ne pas retirer les bouchons pour déposer un échantillon sanguin dans le tube.

CARACTERISTIQUES DE LA PERFORMANCE
Le résultat PRT représente une indication de la concentration de l"héparine en circulation chez un patient particulier. Des valeurs plus faibles obtenues au test PRT indiquent qu'une quantité moindre de protamine est requise pour neutraliser l'héparine présente dans la circulation sanguine du patient. Des rapports cliniques publiés ont montré que la dose de protamine recommandée par le PRT est fréquemment 15 à 40 % inférieure à la dose standard empirique (en se basant sur 1 mg protamine/100 unités d'héparine administrée).[12-15]

Précision
La reproductibilité a été établie en utilisant le Contrôle de la Qualité HEMOCHRON pour le PRT.

	Niveau 1				Niveau 2			
R-PRT200	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Combiné	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Combiné
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Moyenne	138	135	141	138	360	360	362	360
Écart-type	2,5	2,3	4,0	3,7	6,1	2,1	7,6	5,1
CV%	1,8	1,7	2,9	2,7	1,7	0,6	2,1	1,4
R-PRT200K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Moyenne	131	138	139	136	313	317	321	317
Écart-type	2,5	8,5	5,1	6,5	2,3	2,0	3,6	4,3
CV%	1,9	6,2	3,7	4,8	0,7	0,6	1,1	1,4
R-PRT400	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Combiné	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Combiné
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Moyenne	154	158	140	151	405	412	401	406
Écart-type	6,1	2,6	2,1	9,1	8,5	10,4	3,2	8,3
CV%	4,0	1,7	1,5	6,0	2,1	2,5	0,8	2,0
R-PRT400K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Moyenne	141	142	155	146	336	340	333	336
Écart-type	2,1	7,6	5,0	3,7	9,0	12,7	8,5	9,3
CV%	1,5	5,4	3,2	2,7	2,7	3,7	2,6	2,8

Résultats des doses après activation par le kaolin chez les patients de chirurgie cardiaque traités avec l'aprotinine.
Les données cliniques ont été rassemblées dans deux centres, à la suite de l'approbation de l'établissement. A chaque centre, les calculs des doses ont été réalisés manuellement par le perfusionniste ayant réalisé les analyses.

L'efficacité des doses prévues par le PRT est résumée dans le tableau ci-dessous. Le pourcentage de patients ayant reçu la dose telle qu'estimée par les tests PRT avec activation par le kaolin est détaillé à la rubrique « Dosé comme recommandé ».

Dosage de la protamine

Site	Nb de patients	Dosé comme recommandé #	(%)	TCA cible	Pts atteignant le but #	(%)	Dose héparine (x 1000IU) moyen ± ET	Plage
1	77	76	(99)	120	74	(97)	Non rapporté	
2	42	39	(86)	Ligne de base	30	(84)	194,4 ± 56,3	95 – 420

Ces données reflètent l'efficacité des doses déterminées par le système activé par le kaolin en présence d'aprotinine. De larges plages de doses sont prévues dans une étude de population en raison de la sensibilité de chaque patient à l'héparine, la durée de l'intervention et la dose totale d'héparine administrée au cours de l'intervention.

LIMITATIONS DU TEST
1. L'exactitude de la prédiction de la dose de protamine dépend de l'exactitude du volume sanguin calculé du patient. Dans certains cas, les modifications du volume sanguin durant la chirurgie peuvent être importants en raison d'une perfusion excessive de liquides par voie intraveineuse, , de pertes urinaires, de perte de sang et de la transfusion de composants sanguins. Comme avec tout médicament perfusé, , l'utilisateur doit être conscient de ces altérations en raison de leurs effets potentiels sur l'efficacité de la protamine perfusée.
2. L'utilisation de produits sanguins héparinés supplémentaires (c'est-à-dire, globules rouges récupérés d'un système extracorporel) ou d'une plus grande quantité d'héparine à la suite de la réalisation d'un test PRT invalidera les résultats du test et la prédiction de la protamine. Dans cette circonstance, le test PRT doit être répété afin de refléter les exigences en protamine supplémentaires. Après la chirurgie, le patient doit être suivi avec l'ACT et le PDAO pour déterminer la nécessité de perfuser un peu plus de protamine à titre de compensation pour l'effet latent de l'héparine, qui peut résulter en un phénomène de rebond de l'héparine.[17] Dans le cas où l'addition de protamine ne ramènerait pas l'ACT à sa valeur initiale, une coagulopathie acquise doit être suspectée. La réalisation d'un ACT et d'un PDAO démontrent la présence ou l'absence d'héparine et confirment si une quantité supplémentaire de protamine aidera à ramener l'ACT à sa valeur initiale.
3. Le patient résistant à l'héparine nécessite de grandes quantités d'héparine pour prolonger l'ACT. Il est possible que, si les concentrations d'héparine sont extrêmement élevées, le tracé des résultats de l'ACT et du TRP pour déterminer la réponse à la protamine donne une « courbe plate ». Dans ce cas, un message « Out of Range » (Hors des limites) sera affiché sur le modèle HEMOCHRON 8000 et aucune dose recommandée ne sera affichée pour le PRT. Une dose modérée empirique préliminaire de protamine est recommandée dans de telles circonstances. Après avoir neutralisé un pourcentage de l'héparine avec une dose initiale, le PRT et la détermination de l'ACT peuvent être répétés pour calculer la dose appropriée pour neutraliser efficacement l'héparine en circulation qu'il reste.
4. Les tubes activés par du kaolin (R-RPT200K ou R-PRT400K) doivent être utilisés pour les patients recevant de l'aprotinine. Aucune étude n'a été réalisée en utilisant d'autres agents anti-fibrinolytiques.
5. Des analyses *in vitro* ont indiqué une élévation de la dose estimée par le TRP pour des concentrations d'aprotinine dépassant 500 KUI/mL de sang en cas d'utilisation des systèmes activés par le kaolin.[15]
6. Les résultats de tests qui ne correspondent pas aux valeurs prévues doivent être vérifiés et évalués ultérieurement par d'autres moyens diagnostiques.

CONTROLE DE LA QUALITE (QC)
Un contrôle de la qualité et un suivi systématiques doivent faire partie du programme d'assurance de la qualité complet. Des produits de contrôle de la qualité des systèmes de coagulation du sang entier HEMOCHRON sont disponibles afin de rendre le contrôle de la qualité systématique plus facile et plus abordable.

QC quotidien de l'instrument
Les instruments HEMOCHRON doivent subir un contrôle de la qualité avec témoin à deux concentrations après chaque période de 8 heures de fonctionnement. Pour aider à accomplir le QC quotidien, des tubes pour vérification des systèmes électroniques sont disponibles et ils peuvent servir à effectuer des vérifications de contrôle de la qualité de l'instrument avec plusieurs concentrations (normale et anormale). Un tube de vérification de la température est également fourni et il doit être utilisé tous les 6 mois pour vérifier que l'instrument maintient la température appropriée de 37°C ± 1°C. Toute erreur trouvée dans le système de contrôle de la température sera aussi affichée sur l'écran LCD de l'instrument.

Contrôle de la qualité des tubes à essais HEMOCHRON
Chaque boîte de tubes à essai HEMOCHRON doit être validée au moins une fois avant son utilisation. Ceci peut être réalisé en utilisant le contrôle de la qualité liquide HEMOCHRON approprié. Des plages de performance acceptables pour les tubes à essais sont comprises dans chaque kit de produits de contrôle de la qualité HEMOCHRON. Dès que chaque boîte individuelle de tubes à essai a été vérifiée, le tableau « Performance vérifiée » présent sur le panneau latéral de chaque boîte de tubes à essai doit être complété. Cette boîte se trouve maintenant « IN CONTROL » et elle ne nécessitera pas de contrôle de la qualité liquide supplémentaire, à moins que les résultats cliniques observés aient changé.

REMARQUE : Dans le cas de la réception de boîtes multiples au sein d'un même envoi, il est recommandé de valider chaque boîte avant son utilisation.

BIBLIOGRAPHIE

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass. J Extra-Corporeal Tech 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration. J Extra-Corporeal Tech 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay: A comparison of two methods. AMSECT Proceedings, March 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass. Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin. J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes. J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamine: A review of its toxicity. Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test. J Extra Corporeal Tech 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose. J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using *in vitro* heparin and protamine dosing assays. Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, May 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery: The *in vitro* effect of aprotinin. J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery: Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods. Perfusion 14: 181-7, 1999.

HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Test di risposta alla protamina (PRT)

Foglio illustrativo
Italiano

INDICAZIONI PER L'USO
HEMOCHRON® PRT è formulato per la valutazione diagnostica *in vitro* della risposta alla dose di protamina. Le provette HEMOCHRON PRT200 (tappo arancio) e PRT400 (tappo rosso) sono indicate per l'uso in procedure cardiologiche invasive che richiedono l'uso di protamina per la neutralizzazione dell'anticoagulazione eparinica. I saggi PRT con attivazione mediante caolino sono anche indicate nei pazienti che ricevono aprotinina. Con i modelli HEMOCHRON 401, 801, 8000 e *Response* , i test PRT200 e PRT400 devono essere utilizzati conformemente alle prescritte linee guida procedurali HEMOCHRON.

Per uso diagnostico invitro

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE
La dose di protamina solfato necessaria per la neutralizzazione dell'eparina a seguito di interventi di bypass cardiopolmonare si basa normalmente su un rapporto fra protamina e il volume di eparina infuso durante la procedura[1-3], o alternativamente sulla titolazione di protamina.[3, 4] Per via dell'esigenza di determinare le dosi di protamina con precisione maggiore rispetto a quanto possibile con le sole considerazioni di tipo empirico, si è assistito all'evoluzione di protocolli per la titolazione della protamina.

L'accurata determinazione della dose di protamina risulta vantaggiosa a fronte delle note complicanze associate a dosi eccessive o insufficienti di protamina.[5-8] Infatti, dosi inadeguate possono portare ad emorragia di origine eparinica, con conseguente possibile fabbisogno di ulteriore protamina. Per contro, dosi eccessive possono portare ad aumentata evidenza di tossicità protaminica. Altrettanta importanza clinica riveste l'osservazione secondo cui la potenza della protamina nella neutralizzazione eparinica varia a seconda del produttore e del numero di lotto.[9] Un controllo di queste variabili consente la gestione dello stato coagulatorio dei pazienti di bypass cardiopolmonare.

L'obiettivo della titolazione di protamina consiste nel determinare l'esatta dose richiesta per neutralizzare in modo completo l'eparina in circolo di ciascun paziente. La titolazione della protamina comporta l'esecuzione di un test del tempo di coagulazione su un campione ematico eparinizzato, al quale si è aggiunto un volume noto di protamina. La neutralizzazione *in vitro* della protamina è correlata agli effetti in vivo di questa sostanza.[10, 11]

Test di risposta alla protamina
Il test PRT può essere condotto utilizzando la protamina solfato iniettabile fornita dalla farmacia del singolo ospedale. Da alcuni studi emerge che con il sistema RxDx è possibile ottenere esiti ottimali e risultati clinici migliori.[12, 13, 14]

I dati mostrano che l'esecuzione del PRT con queste modalità consente di prevedere con precisione la risposta in vivo alla protamina, sulla base di un saggio *in vitro*.[15]

I test PRT200 e PRT400 sono disponibili con attivatori Celite® (terra di diatomee) o al caolino. Il test PRT con attivatore Celite non è indicato per l'uso con l'inibitore delle proteasi aprotinina (Trasylol®, Bayer Corporation), che può essere somministrato per ridurre le emorragie postoperatorie, particolarmente negli interventi di bypass cardiopolmonare, e che può prolungare il PRT attivato con Celite. Il caolino non risente della presenza di moderate dosi di aprotinina. Il test PRT attivato mediante caolino può essere usato per valutare la risposta alla dose di protamina a prescindere dalla somministrazione o meno di aprotinina al paziente.

Il PRT viene eseguito utilizzando la strumentazione per coagulazione di sangue intero HEMOCHRON modello 401, 801, 8000 o *Response*. Il PRT contiene i reagenti necessari per la determinazione del tempo di coagulazione attivata (ACT) e inoltre una concentrazione corretta di protamina. Il test PRT200 contiene 20 mg/mL di protamina, una concentrazione che corrisponde alla dose media di protamina necessaria per neutralizzare l'eparina al termine dell'intervento di bypass. Il test PRT contiene invece 40 mg/mL di protamina, per i casi che richiedono alti volumi di eparina.

Nel 1975, Bull et al.[11] pubblicarono la metodica della curva dose-risposta, basata sull'ACT, per individualizzare i dosaggi di eparina e protamina. Nel 1983 seguì la descrizione di una metodica per la titolazione di protamina con l'ausilio del sistema HEMOCHRON, per l'automazione della determinazione dell'ACT.4 Il PRT si basa sul principio della curva dose-risposta. Si utilizzano due millilitri (2 mL) di sangue intero del paziente per determinare un ACT di stato, con un PRT contenente 0,04 o 0,08 mg di protamina (a seconda della tipologia di provette utilizzate). Successivamente si genera una curva di risposta alla protamina per il singolo paziente. Utilizzando gli esiti così ottenuti e i dati relativi al paziente[16], si determina la dose di protamina in mg necessaria per la neutralizzazione dell'eparina circolante. La dose da infondere viene calcolata automaticamente da HEMOCHRON *Response* (versione del software 2.0 o successiva) o 8000. Alternativamente è possibile ricorrere al calcolo manuale, utilizzando l'apposita scheda fornita.

Per verificare la neutralizzazione eparinica si può eseguire un ACT e PDAO (tappo arancio). Per i dettagli di questa procedura, consultare il foglio illustrativo per PDAO.

REAGENTI
Le provette HEMOCHRON per test PRT sono indicate per l'uso con sangue intero fresco. Esse contengono un preparato di protamina solfato in forma liofilizzata con l'aggiunta di attivatore, stabilizzanti e tamponi. Le provette PRT200 e PRT400 sono distinguibili dal diverso colore del tappo.

- Ciascuna provetta R-PRT200 (tappo arancio) contiene protamina solfato (0,04 mg), terra di diatomee, stabilizzanti e tamponi.
- Ciascuna provetta R-PRT200K (tappo arancio) contiene protamina solfato (0,04 mg), caolino, stabilizzanti e tamponi.
- Ciascuna provetta R-PRT400 (tappo rosso) contiene protamina solfato (0,08 mg), terra di diatomee, stabilizzanti e tamponi.
- Ciascuna provetta R-PRT400K (tappo rosso) contiene protamina solfato (0,08 mg), caolino, stabilizzanti e tamponi.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ
Le provette HEMOCHRON PRT devono essere conservate a temperatura ambiente controllata (15 – 30°C). Le provette PRT si mantengono stabili fino alla data di scadenza indicata. Evitare l'esposizione prolungata dei kit PRT a temperature superiori a 30°C.
RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Materiali forniti
- Provetta PRT200 (tappo arancio; attivatore Celite o caolino, come indicato)
- Provetta PRT400 (tappo rosso; attivatore Celite o caolino, come indicato)
- Scheda PRT (per calcoli manuali, se necessario)

Materiali necessari
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 o due 401
- Siringhe da 5 mL non siliconate e non eparinizzate, per il prelievo dei campioni ematici
- Ago diritto calibro 20 o maggiore, per il trasferimento dei campioni nelle provette
- Provetta per test ACT: * FTCA510 (tappo nero) o FTK-ACT (tappo oro), come necessario

Attenzione: Prendere tutte le necessarie precauzioni a garanzia dell'uso di una tecnica corretta con le siringhe, per evitare punture accidentali.

Per gli emoprelievi, attenersi alla tecnica corretta (A o B).
A. Linea ematica venosa o arteriosa a permanenza. (Non prelevare sangue da linee eparinizzate di accesso o da lock eparinici a permanenza).
1. Se necessario, interrompere l'infusione di liquidi al paziente.
2. Utilizzando una tecnica con due siringhe, aspirare sangue con due siringhe da 5 mL e gettare la prima siringa.
B. Port per linea ematica extracorporea.
1. Lavare la linea extracorporea di accesso ematico aspirando e gettando 5 mL di sangue.
2. Aspirare 5 mL di sangue intero in una siringa da 5 mL.

PROCEDURA DI TEST
Se si utilizza un kit HEMOCHRON *Response* (versione software 2.0 o successiva) o 8000, il software del sistema quantificherà la dose di protamina in base agli esiti del test PRT200 o PRT400 e alle informazioni fornite dall'utente, come anche ai risultati dell'ACT di stato.

Se si utilizza invece il kit HEMOCHRON *Response* (versione software precedente a 2.0), 401, 801 e la scheda di calcolo PRT, attenersi alla linea guida seguente per determinare quale provetta PRT usare:

PRT 200 (tappo arancio): Il livello stimato di eparina circolante del paziente al momento dell'inversione è inferiore a 6,5 unità/mL.

PRT 400 (tappo rosso): Il livello stimato di eparina circolante del paziente al momento dell'inversione è pari o superiore a 6,5 unità/mL.

NOTA: Questa linea guida risulta idonea per gran parte dei pazienti, tuttavia se si calcolano dosi eccessive, la ripetizione del test con la provetta alternativa può fornire una stima più precisa della dose.

Con i test PRT attivati con Celite, utilizzare una provetta ACT PTCA510 (tappo nero). Con i test PRT attivati con caolino, utilizzare una provetta FTK-ACT (tappo oro).

Protocollo consigliato
1. Prima della neutralizzazione eparinica del paziente, ottenere l'ACT basale.
2. Dopo l'inizio del riscaldamento del paziente, eseguire simultaneamente un test PRT e un ACT di stato. Dalla siringa di prelievo dispensare esattamente 2,0 mL di sangue nella provetta per il test PRT. Premere simultaneamente il pulsante di avvio START per il pozzetto HEMOCHRON corrispondente.
3. Agitare immediatamente la provetta con forza, da un'estremità all'altra, per dieci volte.
4. Inserire la provetta per test PRT nel pozzetto corretto. Ruotare velocemente la provetta in senso orario. Per maggiori informazioni, consultare il manuale dell'operatore.
5. Dalla stessa siringa di prelievo dispensare esattamente 2,0 mL di sangue nella provetta per il test ACT. Premere simultaneamente il pulsante di avvio START per il pozzetto HEMOCHRON corrispondente.
6. Agitare immediatamente la provetta con forza, da un'estremità all'altra, per dieci volte.
7. Inserire la provetta per test ACT nel pozzetto HEMOCHRON corretto. Ruotare velocemente la provetta in senso orario. Per maggiori informazioni, consultare il manuale dell'operatore.
8. Quando si sente il tono di indicazione, registrare l'esito del test.
9. Determinare la dose di protamina per infusione. Vedere la seguente sezione sul Calcolo della dose.

Calcolo della dose
Se si utilizza HEMOCHRON *Response* (versione software 2.0 o successiva), consultare il Manuale dell'operatore per HEMOCHRON *Response* RxDx, per istruzioni dettagliate sull'uso di questo sistema automatizzato di calcolo. Se si utilizza HEMOCHRON 8000, seguire le istruzioni riportate in questo manuale dell'operatore per lo strumento. Se si utilizzano invece HEMOCHRON *Response* con software di versioni precedenti a 2.0, HEMOCHRON 401 o 801, seguire le istruzioni sulla scheda PRT acclusa a questo kit per calcolare la dose di protamina.

Calcolo dell'eparina circolante in fase intraoperatoria
Per questi calcoli è possibile usare HEMOCHRON *Response* (software versione 2.0 o successiva) oppure 8000. Eseguire un test PRT e un ACT di stato. Analogamente a quanto avviene per la procedura di test *in vitro*, gli esiti PRT ottenuti non devono mai sostituire il giudizio clinico del medico curante.

AVVERTENZA SULL'USO DEL PRODOTTO
NOTA: Attenersi sempre alle precauzioni generali.
1. Trasferire i campioni ematici utilizzando un ago di tipo idoneo a perforare i tappi.
2. Ricorrere sempre a una tecnica bimanuale per il trasferimento del sangue. Tenere fermamente la provetta con una mano e dispensare con l'altra mano il campione ematico dalla siringa.
3. Le provette PRT sono realizzate in vetro. Maneggiandole in modo incorretto si rischia di romperle o di incrinarle. Non lasciarle cadere né maneggiarle con forza eccessiva.
4. Le provette per test PRT contengono un attivatore particellare (Celite o caolino) e inoltre un materiale di origine biologica (protamina solfato). Non maneggiare, nebulizzare o ingerire il materiale.
5. Tutte le provette usate contenenti emoderivati umani vanno smaltite in contenitori approvati per rifiuti biologici pericolosi.
6. Non aprire mai i tappi per dispensare il campione nella provetta.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI
L'esito del test PRT è un'indicazione del livello circolante di eparina per il singolo paziente. Valori PRT inferiori denotano l'esigenza di minori volumi di protamina per neutralizzare l'eparina circolante del paziente. I rapporti clinici pubblicati mostrano che la dose di protamina indicata dai PRT è spesso inferiore del [15] – 40% rispetto alla dose empirica standard (1 mg di protamina/100 unità di eparina somministrate).[12-15]

Precisione
Si è determinata la riproducibilità con il Controllo qualitativo HEMOCHRON per PRT.

	Livello 1				Livello 2			
R-PRT200	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Combinato	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Combinato
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	138	135	141	138	360	360	362	360
Dev std	2,5	2,3	4,0	3,7	6,1	2,1	7,6	5,1
CV%	1,8	1,7	2,9	2,7	1,7	0,6	2,1	1,4
R-PRT200K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	131	138	139	136	313	317	321	317
Dev std	2,5	8,5	5,1	6,5	2,3	2,0	3,6	4,3
CV%	1,9	6,2	3,7	4,8	0,7	0,6	1,1	1,4
R-PRT400	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Combinato	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Combinato
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	154	158	140	151	405	412	401	406
Dev std	6,1	2,6	2,1	9,1	8,5	10,4	3,2	8,3
CV%	4,0	1,7	1,5	6,0	2,1	2,5	0,8	2,0
R-PRT400K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	141	142	155	146	336	340	333	336
Dev std	2,1	7,6	5,0	3,7	9,0	12,7	8,5	9,3
CV%	1,5	5,4	3,2	2,7	2,7	3,7	2,6	2,8

Esiti del dosaggio con attivatore al caolino in pazienti di cardiochirurgia trattati con aprotinina
Si sono raccolti dati clinici presso due centri, su approvazione da parte degli istituti interessati. I calcoli delle dosi presso ciascun centro sono stati eseguiti manualmente dal perfusionista responsabile per l'esecuzione dei saggi.

La tabella seguente riassume l'efficacia delle dosi previste dal test PRT. La percentuale dei pazienti cui si è somministrata la dose quantificata con i test PRT con attivatore di caolino è riportata alla voce "Somministrazione come da raccomandazioni".

Dosi di protamina

Centro	N. Pazienti	Somministrazione come da raccomandazioni #	(%)	ACT Target	Pazienti che hanno conseguito il target #	(%)	Dose di eparina (x 1000IU) media ± DS	Range
1	77	76	(99)	120	74	(97)	Non riferita	
2	42	39	(86)	Basale	30	(84)	194,4 ± 56,3	95 – 420

Questi dati rispecchiano l'efficacia della dose del sistema con caolino in presenza di aprotinina. Si prevedono marcate variazioni di dose nello studio di popolazione, alla luce della sensibilità dei singoli pazienti all'eparina, della durata dell'intervento e della dose totale di eparina somministrata durante l'intero intervento.

LIMITI DELLA PROCEDURA
1. La precisione del calcolo della dose di protamina dipende da quella del calcolo del volume ematico del paziente. In alcuni casi si hanno nette alterazioni del volume ematico in fase operatoria, per via dell'eccessiva infusione di liquidi endovena o di perdita urinaria o ematica e della trasfusione di emocomponenti. Come con qualunque medicinale per infusione, l'operatore deve essere consapevole di queste alterazioni, alla luce dei loro effetti potenziali sull'efficacia dell'infusione di protamina.
2. L'uso di ulteriore eparina o di emoprodotti eparinizzati (ossia eritrociti del paziente recuperati dal sistema extracorporeo) a seguito dell'esecuzione del saggio PRT neutralizzerà gli esiti del test e le previsioni per le dosi di protamina. In queste circostanze, ripetere il saggio PRT per rispecchiare l'ulteriore fabbisogno di protamina. Il paziente post-chirurgico va monitorato eseguendo l'ACT e il PDAO, per determinare l'esigenza di infondere altra protamina per compensare l'effetto eparinico latente, che può portare al rebound eparinico.[17] Se anche con l'aggiunta di protamina fosse impossibile ripristinare l'ACT basale, è lecito sospettare una coagulopatia acquisita. Eseguendo un ACT e PDAO è possibile dimostrare la presenza o l'assenza di eparina e confermare se l'aggiunta di protamina possa facilitare il ripristino dell'ACT basale.
3. Nei pazienti resistenti all'eparina sono necessari alti volumi di eparina per ripristinare l'ACT. In presenza di concentrazioni epariniche estremamente elevate, è possibile che, tracciando l'ACT di stato e il PRT per determinare la risposta alla protamina, si ottenga una "curva piatta". In questo caso, su HEMOCHRON Modello 8000 viene visualizzato il messaggio "Out of Range" (Valore fuori campo) e non viene indicata alcuna dose raccomandata per il PRT. In queste circostanze si consiglia di adottare preliminarmente una dose empirica conservativa di protamina. Dopo la neutralizzazione di una percentuale di eparina con la dose iniziale, è possibile ripetere PRT e ACT di stato per calcolare la dose corretta per un'efficace neutralizzazione della restante eparina in circolo.
4. Per i pazienti che ricevono aprotinina, utilizzare esclusivamente provette attivate con caolino (R-PRT200K o R-PRT400K). Non sono stati condotti studi con l'uso di altri agenti antifibrinolitici.
5. Le analisi *in vitro* hanno indicato un innalzamento della dose prevista dal test PRT in presenza di concentrazioni di aprotinina oltre 500 KUI/mL di sangue, con l'uso del sistema attivato mediante caolino.[15]
6. Se si ottengono esiti non coerenti con i valori attesti, verificarli e poi procedere a valutazioni con sistemi diagnostici di tipo alternativo.

CONTROLLO QUALITATIVO (CQ)
Qualsiasi programma completo di garanzia della qualità deve includere verifiche e controlli di routine della qualità. Sono disponibili prodotti per il Controllo qualitativo del Sistema per coagulazione di sangue intero HEMOCHRON, per l'esecuzione di controlli routinari della qualità in modo comodo e a costo contenuto.

CQ giornaliero della strumentazione
La qualità della strumentazione HEMOCHRON deve essere controllata a due livelli, ogni 8 ore di funzionamento. Per facilitare il CQ giornaliero, sono disponibili provette di verifica per sistemi elettronici, che possono eseguire controlli qualitativi di vari livelli sulla strumentazione. Si offre inoltre una provetta di verifica della temperatura, da usarsi ogni 6 mesi a conferma del mantenimento della temperatura corretta da parte dello strumento, ossia 37°C ± 1°C. Gli eventuali errori riscontrati nel sistema di controllo della temperatura sono anche visualizzati dallo strumento, sullo schermo a cristalli liquidi.

CQ delle provette HEMOCHRON
Convalidare ciascuna confezione di provette HEMOCHRON almeno una volta prima dell'uso. Per farlo, utilizzare l'apposito Controllo liquido HEMOCHRON. Ogni kit per il controllo qualitativo HEMOCHRON include gli intervalli prestazionali accettabili per le provette. Una volta verificata ogni singola confezione di provette, compilare la tabella "Prestazioni verificate" riportata sul lato della confezione. Ora la confezione è "IN CONTROLLO" e non si richiede l'uso di ulteriori controlli liquidi, a meno che non si assista a una variazione negli esiti clinici.

NOTA: Se si ricevono più confezioni con la stessa consegna, si consiglia di convalidare ciascuna confezione prima dell'uso.

BIBLIOGRAFIA

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass. J Extra-Corporeal Tech 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration. J Extra-Corporeal Tech 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay: A comparison of two methods. AMSECT Proceedings, March 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass. Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin. J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes. J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamine: A review of its toxicity. Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test. J Extra Corporeal Tech 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose. J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using *in vitro* heparin and protamine dosing assays. Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, May 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery: The *in vitro* effect of aprotinin. J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery: Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods. Perfusion 14: 181-7, 1999.

CE

HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Prueba de Respuesta a Protamina (PRT)

Folleto
Español

INDICACIONES DE USO
La PRT EMOCHRON® ha sido diseñada para la evaluación de la respuesta a la dosis de protamina en diagnóstico *in vitro*. Los tubos de ensayo con tapón color melocotón HEMOCHRON PRT200 y con tapón rojo PRT400 se recomiendan para uso en procedimientos de cardiología invasiva que requieren protamina para la neutralización de la anticoagulación con heparina. Las pruebas PRT activadas por caolín también pueden ser usadas en pacientes que están recibiendo aprotinina. Los PRT200 y PRT400 deberán ser usados con las directrices de procedimiento HEMOCHRON establecidas para los modelos HEMOCHRON 401, 801, 8000 y *Response*.

Para uso diagnóstico *in vitro*

RESUMEN Y EXPLICACIÓN
La dosis de sulfato de protamina requerida para neutralizar la heparina después de la cirugía de bypass cardiopulmonar se basa comúnmente en una determinada proporción de protamina con respecto a la cantidad de heparina infundida durante el procedimiento[1-3], o en la titulación de protamina.[3,4] Los protocolos para llevar a cabo la titulación de protamina han evolucionado debido a la necesidad de determinar las dosis de protamina de manera más precisa de lo que puede conseguirse con base en consideraciones empíricas solamente.

La determinación precisa de la dosis de protamina es conveniente en vista de las conocidas complicaciones relacionadas con el exceso o la insuficiencia de protamina.[5-8] Una dosis demasiado baja puede causar hemorragia relacionada con la heparina y puede requerir heparina adicional. Una dosis de protamina demasiado alta puede resultar en signos crecientes de toxicidad causada por la protamina. De igual importancia clínica es la observación de que la potencia neutralizadora de la protamina contra la heparina varía de acuerdo con el fabricante y el número de lote del producto.[9] El control del estado de coagulación del paciente sometido a cirugía de bypass cardiopulmonar se optimiza cuando se controlan estas variables relacionadas con la protamina.

El propósito de la titulación de protamina es determinar la dosis de protamina exacta requerida para neutralizar por completo la heparina circulante en un paciente determinado. La titulación de protamina requiere la ejecución de una prueba del tiempo de coagulación en una muestra de sangre heparinizada a la cual se ha añadido una cantidad conocida de protamina. La neutralización de la heparina con protamina *in vitro* se correlaciona con los efectos in vivo de la protamina.[10,11]

Prueba de respuesta a la protamina
La PRT puede ser realizada en conjunción con el sulfato de protamina inyectable suministrado por la farmacia de cada hospital. Los estudios han demostrado que el uso del sistema RxDx brinda óptimos resultados y mejores respuestas clínicas.[12,13,14]

Los datos muestran que la ejecución de la PRT de este modo permite predecir con precisión la respuesta in vivo a la protamina a partir de una prueba *in vitro*.[15]

Las pruebas PRT200 y PRT400 están disponibles con los activadores Celite® (tierra de diatomeas) o caolín. La prueba PRT activada con Celite no se ha diseñado para uso con el inhibidor de proteasas aprotinina (Trasylol®, Bayer Corporation), la cual puede ser administrada para reducir hemorragias postoperatorias, especialmente durante la cirugía de bypass cardiopulmonar, y puede prolongar la PRT activada por Celite. El caolín no es afectado por dosis moderadas de aprotinina. La PRT activada por caolín puede usarse para evaluar la respuesta a la dosis de protamina en pacientes que estén o no recibiendo aprotinina.

La PRT se lleva a cabo usando los modelos 401, 801, 8000 o *Response* del instrumento HEMOCHRON para la monitorización de la coagulación de la sangre total. La PTR contiene los reactivos requeridos para ejecutar una prueba de tiempo de coagulación activado (ACT) más una concentración adecuada de protamina. El PRT200 contiene 20 µg/mL de protamina, una concentración que corresponde a la dosis de protamina media requerida para neutralizar la heparina al final de la cirugía de bypass. El PRT400 contiene 40 µg/mL de protamina para uso en casos que requieren grandes cantidades de heparina.

En 1975, Bull et al.[11] publicaron el método de determinación de la curva dosis-respuesta basado en el ACT para especificar las dosis de heparina y protamina. En 1983 se describió un método de titulación de protamina con el uso de HEMOCHRON para automatizar la ejecución de la prueba ACT.[4] La PRT se basa en los principios de la curva dosis-respuesta. Se usan dos mililitros (2 mL) de sangre total del paciente para determinar un ACT de estado y una PRT que contenga 0,04 mg ó 0,08 mg de protamina (según el tipo de tubo). Para cada paciente individual se construye una curva de respuesta a la protamina. Usando estos resultados y los datos del paciente16 se determina, en mg, la dosis de protamina requerida para neutralizar la heparina circulante. La dosis de infusión es calculada automáticamente por el HEMOCHRON *Response* (versión de software 2.0 ó superior) o por el modelo 8000, o bien manualmente usando la hoja de trabajo incluida.

La neutralización de heparina puede verificarse mediante un ACT y un PDAO (tapón color naranja). Vea detalles de este procedimiento en el prospecto del PDAO.

REACTIVOS
Los tubos de ensayo HEMOCHRON PRT están diseñados para uso con sangre total fresca. Los tubos de ensayo contienen una preparación liofilizada de sulfato de protamina con activador, estabilizadores y tampones añadidos. Los tubos de ensayo PRT200 y PRT400 se incluyen con tapones codificados con colores.
- Cada tubo R-PRT200 (tapón color melocotón) contiene sulfato de protamina (0,04 mg), tierra de diatomeas, estabilizadores y tampones.
- Cada tubo R-PRT200K (tapón color melocotón) contiene sulfato de protamina (0,04 mg), caolín, estabilizadores y tampones.
- Cada tubo R-PRT400 (tapón color rojo) contiene sulfato de protamina (0,08 mg), tierra de diatomeas, estabilizadores y tampones.
- Cada tubo R-PRT400K (tapón color rojo) contiene sulfato de protamina (0,08 mg), caolín, estabilizadores y tampones.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD
Los tubos HEMOCHRON PRT deberán ser conservados a una temperatura ambiente controlada (15 - 30°C). Los tubos PRT son estables hasta la fecha de caducidad indicada. Evite una exposición prolongada de los kits PRT a temperaturas superiores a 30°C.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS
Materiales incluidos.
- Tubo de ensayo PRT200 (tapón color melocotón, activado con Celite o caolín, según convenga).
- Tubo de ensayo PRT400 (tapón color rojo, activado con Celite o caolín, según convenga).
- Hoja de trabajo PRT (para cálculos manuales, si se requieren).

Materiales requeridos
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 ó dos 401.
- Jeringas de 5 mL sin siliconizar ni heparinizar para la recogida de muestras de sangre.
- Aguja recta calibre núm. 20 ó de mayor tamaño para la transferencia de la muestra de sangre al tubo de ensayo.
- Tubo de ensayo ACT: FTCA510 (tapón negro) o FTK-ACT (tapón dorado), según convenga.

PRECAUCIÓN: Deberán adoptarse todas las precauciones para el uso correcto de las jeringas para evitar pinchazos accidentales.

En la recogida de sangre se deberá observar el método correcto (A o B):
A. Línea permanente para sangre arterial o venosa. (No obtenga sangre de una línea de acceso heparinizada o de un "sello de heparina" permanente.)
1. Interrumpa la perfusión por goteo, si se requiere.
2. Empleando una técnica con dos jeringas, extraiga 5 mL con cada jeringa y deseche la primera de ellas.
B. Puerto de la línea de circulación extracorpórea de sangre.
1. Purgue el acceso de la línea extracorpórea extrayendo y desechando 5 mL de sangre.
2. Extraiga 5 mL de sangre total con una jeringa de 5 mL.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA
Si usa el HEMOCHRON *Response* (versión de software 2.0 ó superior) u 8000, el software del sistema cuantificará la dosis de protamina basado en los resultados de las pruebas PRT200 ó PRT400 y en la información suministrada por el usuario, junto con los resultados del ACT de estado.

Si usa el HEMOCHRON *Response* (versión de software inferior a 2.0), 401, 801 y la hoja de trabajo de cálculo de la PRT, deberá observarse la siguiente directriz para determinar el tubo PRT que debe ser utilizado:

PRT 200 (tapón color melocotón): El nivel de heparina circulante valorado en el paciente en el momento de la reversión de la heparinización es inferior a 6,5 unidades/mL.

PRT 400 (tapón color rojo): -El nivel de heparina circulante valorado en el paciente en el momento de la reversión de la heparinización es superior o igual a 6.5 unidades/mL.

NOTA: Aunque esta directriz es apropiada para la mayoría de los pacientes, en casos donde se calculan dosis excesivas, la repetición de la prueba con el tubo alternativo puede brindar una valoración de la dosis más precisa.

Si se usan pruebas PRT activadas con Celite, deberá utilizarse un FTCA510 (tapón negro) para ACT. Si se usan pruebas PRT activadas con caolín, deberá utilizarse un FTK-ACT (tapón dorado).

Protocolo recomendado
1. Antes de proceder a la neutralización de la heparina del paciente, obtenga los valores basales del ACT.
2. Una vez que se ha iniciado el recalentamiento del paciente, ejecute simultáneamente una prueba PRT y un ACT de estado. Inyecte en el tubo de ensayo PRT exactamente 2,0 mL de la sangre contenida en la jeringa de recogida.. Al mismo tiempo, pulse el botón START (inicio) del pocillo de prueba HEMOCHRON apropiado.
3. Agite inmediatamente el tubo de ensayo de forma enérgica diez veces de extremo a extremo.
4. Inserte el tubo de ensayo PRT en el pocillo de prueba apropiado. Gire rápidamente el tubo en el sentido de las agujas del reloj. Para información adicional consulte el manual del operador del instrumento apropiado.
5. Desde la misma jeringa de recogida, introduzca exactamente 2,0 mL de sangre en el tubo ACT. Al mismo tiempo, pulse el botón START (inicio) del pocillo de prueba HEMOCHRON apropiado.
6. Agite inmediatamente el tubo de ensayo de forma enérgica diez veces de extremo a extremo.
7. Inserte el tubo de ensayo ACT en el pocillo de prueba HEMOCHRON apropiado. Gire rápidamente el tubo en el sentido de las agujas del reloj. Para información adicional consulte el manual del operador del instrumento apropiado.
8. Al oír el tono indicador, anote el resultado de la prueba.
9. Determine la dosis de infusión de protamina. Vea a continuación "Cálculos de dosis".

Cálculos de dosis
Si usa el HEMOCHRON *Response* (versión de software 2.0 ó superior), consulte el manual del operador RxDx HEMOCHRON *Response* para instrucciones detalladas sobre la utilización de este sistema de cálculo automatizado. Si usa el HEMOCHRON 8000, siga las instrucciones del manual del operador de este instrumento. Si usa el HEMOCHRON *Response* con versiones de software inferiores a 2.0, HEMOCHRON 401 ó 801, siga las instrucciones de la hoja de trabajo PRT incluida en este kit para calcular la dosis de protamina.

Cálculo de heparina circulante durante el procedimiento
Esto puede hacerse usando el HEMOCHRON *Response* (versión de software 2.0 ó superior) o el 8000. Ejecute una PRT y un ACT de estado. Como ocurre con cualquier otro procedimiento de prueba *in vitro*, los resultados de la PRT no deberán reemplazar nunca la opinión clínica del médico a cargo.

ADVERTENCIA SOBRE EL USO DEL PRODUCTO
NOTA: Observe en todo momento las precauciones universales.
1. La muestra de sangre deberá ser transferida utilizando una aguja de transferencia adecuada para perforar el tapón.
2. Utilice siempre ambas manos para la transferencia de sangre. Con una mano se sujeta firmemente el tubo mientras que con la otra se transfiere la muestra de sangre desde la jeringa.
3. Los tubos de ensayo PRT son de vidrio. Pueden romperse o agrietarse con facilidad si se manejan descuidadamente. No tire ni deje caer los tubos.
4. Los tubos de ensayo PRT contienen un activador de material particulado (Celite o caolín) así como un material de origen biológico (sulfato de protamina). No manipule ni pulverice en forma de aerosol ni ingiera este material.
5. Todos los tubos de ensayo que contienen sangre de procedencia humana deberán ser desechados en recipientes aprobados para productos biológicos peligrosos.
6. No quite los tapones para introducir una muestra de sangre en el tubo.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO
El resultado de la PRT es una indicación del nivel de heparina circulante en un determinado paciente. Unos valores PRT bajos indican la necesidad de una menor cantidad de protamina para neutralizar la heparina en el torrente sanguíneo del paciente. Informes clínicos publicados han mostrado que la dosis de protamina recomendada por la prueba PRT es frecuentemente entre un 15% y un 40% más baja que la dosis empírica estándar (1 mg de protamina / 100 unidades de heparina administradas).[12-15]

Precisión
La reproducibilidad fue determinada usando el control de calidad HEMOCHRON para la PRT.

	Nivel 1				Nivel 2			
R-PRT200	Día 1	Día 2	Día 3	Combinados	Día 1	Día 2	Día 3	Combinados
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	138	135	141	138	360	360	362	360
Desv. est.	2.5	2.3	4.0	3.7	6.1	2.1	7.6	5.1
CV%	1.8	1.7	2.9	2.7	1.7	0.6	2.1	1.4
R-PRT200K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	131	138	139	136	313	317	321	317
Desv. est.	2.5	8.5	5.1	6.5	2.3	2.0	3.6	4.3
CV%	1.9	6.2	3.7	4.8	0.7	0.6	1.1	1.4
R-PRT400	Día 1	Día 2	Día 3	Combinados	Día 1	Día 2	Día 3	Combinados
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	154	158	140	151	405	412	401	406
Desv. est.	6.1	2.6	2.1	9.1	8.5	10.4	3.2	8.3
CV%	4.0	1.7	1.5	6.0	2.1	2.5	0.8	2.0
R-PRT400K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Media	141	142	155	146	336	340	333	336
Desv. est.	2.1	7.6	5.0	3.7	9.0	12.7	8.5	9.3
CV%	1.5	5.4	3.2	2.7	2.7	3.7	2.6	2.8

Resultados de la determinación de la dosificación con activación con caolín en pacientes sometidos a cirugía cardiaca tratados con aprotinina
Se recogieron datos clínicos en dos centros después de obtener aprobación institucional. Los cálculos de dosificación en cada centro fueron realizados manualmente por el perfusionista encargado de realizar las pruebas.

La eficacia de las dosis predichas por PRT se resume en la tabla siguiente. El porcentaje de pacientes que recibieron la dosis cuantificada mediante las pruebas PRT con caolín se muestra bajo el encabezamiento "Dosificados según lo recomendado".

Dosificación de protamina

Centro	Núm. De Pacientes	Dosificados Según Lo Recomendado #	(%)	Act Objetivo	Pacientes Que Lograron El Objetivo #	(%)	Dosis De Heparina (x 1000IU) media ± SD	Rango
1	77	76	(99)	120	74	(97)	No Informado	
2	42	39	(86)	Línea De Base	30	(84)	194,4 ± 56,3	95 – 420

Estos datos reflejan la eficacia de la dosificación determinada con el sistema con caolín en presencia de la aprotinina. En un estudio poblacional se prevén amplios intervalos de dosis debido a la sensibilidad a la heparina de cada paciente individual, la duración del procedimiento y la dosis de heparina total administrada en todo el procedimiento.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
1. La precisión de la predicción de las dosis de protamina depende de la precisión del cálculo del volumen de sangre del paciente. En ciertos casos, los cambios de volumen de sangre durante la cirugía pueden ser muy grandes debido una excesiva infusión de líquidos intravenosos, pérdida urinaria, pérdida sanguínea y transfusión de componentes sanguíneos. Como ocurre con cualquier medicación por infusión, el usuario debe tener en cuenta estas alteraciones en razón de sus posibles efectos sobre la eficacia de la infusión de protamina.
2. El uso de heparina adicional o de componentes de la sangre heparinizados (i.e., hematíes rescatados del sistema extracorpóreo) después de haber realizado la prueba PRT invalidará los resultados de la prueba y el cálculo de predicción de la dosis de protamina. En este caso, la prueba PRT deberá repetirse para reflejar la necesidad adicional de protamina. El paciente postoperatorio deberá vigilarse con el ACT y el PDAO para determinar la necesidad de infundir protamina adicional con el fin de compensar el efecto latente de la heparina, el cual puede posiblemente resultar en un rebote de heparina.[17] Si la adición de protamina no consigue restaurar los valores basales del ACT, deberá sospecharse una coagulopatía adquirida. La ejecución de un ACT y PDAO demostrará la presencia o ausencia de heparina y confirmará si la adición de protamina ayudará a restaurar los valores basales del ACT.
3. Los pacientes resistentes a la heparina requieren grandes cantidades de heparina para prolongar el ACT. Si las concentraciones de heparina son extremadamente elevadas, es posible que la gráfica de los resultados del ACT de estado y de la PTR para determinar la respuesta a la protamina muestre una "curva plana". Si ocurre esto, un mensaje de "Out of Range" (Fuera de intervalo) será visualizado en el HEMOCHRON Modelo 8000 y no se mostrará la dosis recomendada para la PRT. En tales circunstancias se recomienda usar una dosis empírica conservadora de protamina. Después de neutralizar un porcentaje de heparina con una dosis inicial, la PRT y el ACT de estado pueden repetirse para calcular la dosis adecuada para neutralizar eficazmente la heparina circulante remanente.
4. Solamente deberán utilizarse tubos activados con caolín (R-PRT200K o R-PRT400K) en los pacientes que reciben aprotinina. No se han llevado a cabo estudios con el uso de otros agentes antifibrinolíticos.
5. Los análisis *in vitro* han indicado una elevación de la dosis predicha por PRT, con el uso de concentraciones de aprotinina superiores a 500 KIU/mL de sangre cuando se usa el sistema activado con caolín.[15]
6. Los resultados de la prueba que no concuerden con los valores esperados deberán ser verificados y después evaluados mediante un método de diagnóstico alternativo.

CONTROL DE CALIDAD (CC)
La realización de pruebas y de seguimiento sistemáticos para el control de la calidad son una parte esencial de cualquier programa completo de aseguramiento de la calidad. Pueden adquirirse productos de control de calidad para el Sistema de Coagulación de Sangre Total HEMOCHRON para hacer que el CC rutinario sea conveniente y rentable.

CC diario del instrumento
El control de calidad de los instrumentos HEMOCHRON deberá hacerse a dos niveles cada 8 horas de funcionamiento. Para facilitar el CC diario, pueden adquirirse tubos de verificación de sistema electrónico capaces de efectuar verificaciones del control de calidad a nivel múltiple (normal y anormal) en el instrumento. También se incluye un tubo de verificación de temperatura que debe ser usado cada seis meses para verificar que el instrumento mantiene la temperatura correcta de 37°C ± 1°C. Cualquier error que se detecte en el sistema de control de temperatura también será mostrado en la pantalla LCD del instrumento.

CC de los tubos de ensayo HEMOCHRON
Cada caja de tubos de ensayo HEMOCHRON deberá ser validada por lo menos una vez antes de ser usada. Esto puede efectuarse utilizando el control de calidad líquido HEMOCHRON adecuado. Con cada kit de producto de control de calidad HEMOCHRON se incluyen intervalos de rendimiento aceptables para los tubos de ensayo. Después de verificar cada caja individual de tubos de ensayo, deberá rellenarse la tabla de "Rendimiento verificado" incluida en el panel lateral de cada caja de tubos de ensayo. Esta caja estará ahora "BAJO CONTROL" y no requerirá más pruebas de calidad con el control líquido a menos que se observe un desplazamiento de los valores de los resultados clínicos.

NOTA: Si se reciben múltiples cajas dentro de la misma remesa, se recomienda validar cada caja antes de su uso.

REFERENCIAS

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass. J Extra-Corporeal Tech 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration. J Extra-Corporeal Tech 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay: A comparison of two methods. AMSECT Proceedings, March 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass. Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin. J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes. J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamine: A review of its toxicity. Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test. J Extra Corporeal Tech 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose. J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II. The use of a dose-*Response* curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using *in vitro* heparin and protamine dosing assays. Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, May 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery: The *in vitro* effect of aprotinin. J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery: Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods. Perfusion 14: 181-7, 1999.

CE

HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Teste de Resposta da Protamina (PRT)

Folheto
Português

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
O HEMOCHRON® PRT é concebido para avaliação da resposta à dosagem da protamina em diagnóstico *in vitro*. Os tubos de teste HEMOCHRON PRT200 de topo cor de pêssego e os PRT400 de topo vermelho são recomendados para utilização em procedimentos de cardiologia invasivos, que requeiram protamina para neutralização da anticoagulação por heparina. Os testes PRT activados por caulino podem ser também utilizados por pacientes a receber aprotinina. Os PRT200 e PRT400 devem ser utilizados com normas de procedimento estabelecidas pela HEMOCHRON com os modelos HEMOCHRON 401, 801, 8000 e *Response*.

Para utilização em Diagnóstico *in vitro*

RESUMO E EXPLICAÇÃO
A dose de sulfato de protamina, necessária para neutralizar a heparina após cirurgia de bypass cardiopulmonar, é geralmente baseada numa proporção de protamina para a quantidade de heparina infundida durante o procedimento[1-3], ou pela titulação da protamina. [3,4] Os protocolos para a realização da titulação da protamina evoluíram devido à necessidade de determinar as dosagens de protamina com mais precisão do que é possível obter com base unicamente em considerações empíricas.

A determinação precisa da dose de protamina é vantajosa face às complicações conhecidas associadas ao excesso ou insuficiência de protamina.[5-8] Uma dose demasiado baixa pode resultar em hemorragia relacionada com a heparina e pode requerer uma quantidade mais elevada de protamina. Uma dose de protamina demasiado elevada pode resultar numa evidência de toxicidade da protamina. De igual importância clínica é a observação de que o poder da protamina para neutralização da heparina varia, dependendo do fabricante e do número de lote.[9] O controlo do estado de coagulação do paciente de cirurgia de bypass cardiopulmonar é optimizado quando estas variáveis da protamina são controladas.

A finalidade da titulação da protamina é a determinação da dosagem exacta de protamina necessária para neutralizar completamente a heparina circulante em qualquer paciente em particular. A titulação da protamina envolve a realização de um tempo de coagulação numa amostra de sangue heparinizado à qual foi adicionada uma porção conhecida de protamina. A neutralização da heparina pela protamina *in vitro* está correlacionada com os efeitos da protamina in vivo.[10,11]

Teste de Resposta da Protamina
O PRT pode ser realizado em conjunto com o sulfato de protamina injectável fornecido pela farmácia de cada hospital. Estudos feitos demonstraram que a utilização do sistema RxDx possibilita óptimos resultados e melhores efeitos clínicos.[12,13,14]

Os dados obtidos mostram que a execução do PRT desta maneira possibilita a previsão precisa da resposta in vivo à protamina a partir de um ensaio *in vitro*.[15]

Os testes PRT200 e PRT400 estão disponíveis com Celite® (terra diatomácea) ou com activadores de caulino. O teste PRT activado com Celite não se destina a ser utilizado com o inibidor da protease, a aprotinina (Trasylol®, Bayer Corporation), que pode ser administrado para reduzir a hemorragia pós operatória, especialmente durante a cirurgia de bypass cardiopulmonar e pode prolongar o PRT activado com Celite. O caulino não é afectado por doses moderadas de aprotinina. O PRT activado com caulino pode ser utilizado para avaliação da resposta à dosagem da protamina em pacientes, quer os mesmos estejam ou não a receber aprotinina.

O PRT é realizado utilizando os modelos 401, 801, 8000 ou *Response* do instrumento de Coagulação de Sangue Total HEMOCHRON. O PRT contém os reagentes necessários para realizar um Tempo de Coagulação Activado (ACT) bem como uma concentração adequada de protamina. O PRT200 contém 20 µg/mL de protamina, uma concentração que corresponde a uma dosagem média da protamina necessária para neutralizar a heparina no final da cirurgia de bypass. O PRT400 contém 40 µg/mL de protamina para utilização em casos que requeiram grandes quantidades de heparina.

Em 1975, Bull e col.[11] publicaram o método de curva de resposta à dosagem, baseado no ACT, para individualização das dosagens de heparina e protamina. Um método de titulação da protamina utilizando o HEMOCHRON para automatizar o desempenho do ACT foi descrito em 1983.[4] O PRT é baseado no princípio de curva de resposta à dosagem. São utilizados dois mililitros (2 mL) de sangue total do paciente para realizar um estado ACT e um PRT que contenha 0,04 mg ou 0,08 mg (dependendo do tipo de tubo) de protamina. É construída uma curva de resposta à protamina para cada paciente. Utilizando estes resultados e os dados do paciente[16], é determinada a dose de protamina em mg necessária para neutralizar a heparina circulante. A dose de infusão calculada automaticamente pelo HEMOCHRON *Response* (versão de software 2.0 ou superior) ou 8000, ou manualmente utilizando a folha de cálculo fornecida.

A neutralização da heparina pode ser verificada através da realização de um ACT e PDAO (topo laranja). Consulte o folheto informático do PDAO para detalhes deste procedimento.

REAGENTES
Os tubos de teste HEMOCHRON PRT destinam-se a ser utilizados com sangue total fresco. Os tubos de teste contêm uma preparação liofilizada de sulfato de protamina com activador, estabilizadores e tampões adicionados. Os tubos de teste PRT200 e PRT400 estão equipados com tampas codificadas por cores.
- Cada tubo R-PRT200 (topo cor de pêssego) contém sulfato de protamina (0,04 mg), terra diatomácea, estabilizadores e tampões.
- Cada tubo R-PRT200K (topo cor de pêssego) contém sulfato de protamina (0,04 mg, caulino, estabilizadores e tampões.
- Cada tubo R-PRT400 (topo vermelho) contém sulfato de protamina (0,08 mg), terra diatomácea, estabilizadores e tampões.
- Cada tubo R-PRT400K (topo vermelho) contém sulfato de protamina (0,08 mg, caulino, estabilizadores e tampões.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
Os tubos HEMOCHRON PRT devem ser armazenados à temperatura ambiente controlada (15 - 30°C). Os tubos PRT são estáveis até à data de validade marcada. Evitar a exposição prolongada dos kits PRT a temperaturas superiores a 30°C.

RECOLHA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS
Materiais Fornecidos
- Tubo de teste PRT200 (topo cor de pêssego, activado com Celite ou caulino, conforme adequado).
- Tubo de teste PRT400 (topo vermelho, activado com Celite ou caulino, conforme adequado).
- Folha de cálculo PRT (para cálculo manual, se pretendido).

Materiais Necessários
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 ou dois 401s.
- Seringas de 5 mL não-siliconizadas, não heparinizadas, para recolha de amostras de sangue.
- Agulha rectilínea de calibre 20 ou superior para transferência da amostra de sangue para dentro do tubo de teste.
- Tubo de teste ACT: FTCA510 (topo preto) ou FTK-ACT (topo dourado), conforme adequado.

Advertência: Devem ser tomadas todas as precauções para que seja utilizada a técnica adequada com seringas, a fim de evitar picadas de agulha acidentais.

Para colheita de sangue adira à técnica adequada (A ou B):
A. Linha de sangue venoso ou arterial inserida. (Não colha sangue através de uma linha de acesso heparinizada ou caixa de heparina inserida).
1. Impedir o gotejamento de fluidos, se pretendido.
2. Utilizando uma técnica com duas seringas, tire duas seringas de 5 mL e deite fora a primeira seringa.
B. Porta da linha de sangue extracorporal.
1. Irrigue a linha de acesso de sangue extracorporal retirando e deitando fora 5 mL de sangue.
2. Tire 5 mL de sangue total para dentro de uma seringa de 5 mL.

PROCEDIMENTO DE TESTE
Caso se utilize o HEMOCHRON *Response* (versão de software 2.0 ou superior) ou 8000, o software do sistema quantificará a dose de protamina, com base nos resultados de testes PRT200 ou PRT400 e informação fornecida pelo utilizador, juntamente com os resultados do estado ACT.

Caso se utilize o HEMOCHRON *Response* (versão de software inferior a 2.0) 401, 801 e a folha de cálculo PRT, use a seguinte norma, para determinar qual dos tubos PRT deve usar.

PRT 200 (Topo cor de pêssego): O nível estimado de heparina circulante do paciente na altura da reversão é inferior a 6,5 unidades/mL.

PRT 400 (Topo vermelho): -O nível estimado de heparina circulante do paciente na altura da reversão é superior ou igual a 6,5 unidades/mL.

NOTA: Embora esta norma seja adequada para a maior parte dos pacientes, nos casos em que são calculadas doses excessivas, a repetição do teste com o tubo alternativo pode produzir uma estimativa de dose mais precisa.

Caso se utilize testes PRT activados com Celite, deve ser utilizado um FTCA510 ACT (topo preto). Caso se utilize PRT activado com caulino, deve ser utilizado um FTK-ACT (topo dourado).

Protocolo Recomendado
1. Antes da neutralização da heparina do paciente, obtenha o ACT na linha de base.
2. Uma vez que tenha início o reaquecimento do paciente, execute simultaneamente um teste PRT e um estado ACT. Da seringa de colheita, dispense exactamente 2,0 mL de sangue para dentro do tubo de teste PRT. Ao mesmo tempo, prima o botão START do poço de teste HEMOCHROM adequado.
3. Agite imediatamente o tubo de teste de forma vigorosa, dez vezes de extremidade a extremidade.
4. Insira o tubo de teste PRT no poço de teste adequado. Faça rodar rapidamente o tubo no sentido dos ponteiros do relógio. Consulte o manual do operador do instrumento adequado, para mais informações.
5. Da mesma seringa de colheita, dispense exactamente 2,0 mL de sangue para dentro do tubo ACT. Ao mesmo tempo, prima o botão START do poço de teste HEMOCHROM adequado.
6. Agite imediatamente o tubo de teste de forma vigorosa, dez vezes de extremidade a extremidade.
7. Insira o tubo de teste ACT no poço de teste HEMOCHRON adequado. Faça rodar rapidamente o tubo no sentido dos ponteiros do relógio. Para mais informações, consulte o manual do operador do instrumento adequado.
8. Quando ouvir o sinal sonoro indicador, registe o resultado do teste.
9. Determine a dose de infusão de protamina. Veja Cálculo de Dose, mais abaixo.

Cálculo de Dose
Caso se utilize o HEMOCHRON *Response* (versão de software 2.0 ou superior), consulte o Manual do Operador do HEMOCHRON *Response* RxDx para instruções detalhadas sobre a utilização deste sistema de cálculo automático. Caso se utilize o HEMOCHRON 8000, siga as instruções no manual do operador deste instrumento. Caso se utilize o HEMOCHRON *Response* com as versões de software inferiores a 2.0, HEMOCHRON 401 ou 801, siga as instruções na folha de cálculo PRT fornecida com este kit para cálculo da dose de protamina.

Cálculo da Heparina Circulante Intra-procedimentalmente
Isto pode ser feito usando o HEMOCHRON *Response* (versão de software 2.0 ou superior) ou 8000. Realize um PRT e um estado ACT. Como acontece com qualquer outro procedimento de teste *in vitro*, os resultados PRT nunca deverão substituir a avaliação clínica do médico assistente.

ADVERTÊNCIA QUANTO À UTILIZAÇÃO DO PRODUTO
NOTA: Cumpra sempre as precauções universais.
1. A amostra de sangue deve ser transferida utilizando uma agulha de transferência adequada para perfurar a tampa.
2. Use sempre uma técnica de duas mãos para transferência do sangue. Uma mão segura com firmeza o tubo, enquanto que a segunda mão dispensa a amostra de sangue da seringa.
3. Os tubos de teste PRT são de vidro. Os mesmos podem partir-se ou estalar quando manipulados de forma inadequada. Não deixe cair ou arremesse os tubos.
4. Os tubos de teste PRT contêm um activador em partículas (Celite ou caulino) bem como um material de origem biológica (sulfato de protamina). Não manipule, inale ou ingira o material.
5. Todos os tubos de teste usados que contenham derivados de sangue humano devem ser eliminados em contentores aprovados para resíduos com risco biológico.
6. Não retire as tampas para fornecer uma amostra de sangue para o tubo.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO
O resultado PRT é uma indicação do nível de heparina circulante de cada paciente. Os valores PRT mais baixos indicam e necessidade de menor quantidade de protamina para neutralizar a heparina na corrente sanguínea do paciente. Relatórios clínicos publicados têm mostrado que a dose de protamina PRT recomendada é frequentemente 15% a 40% mais baixa do que a dose padrão empírica (1 mg protamina/100 unidades de heparina administrados).[12-15]

Precisão
A reprodutibilidade foi determinada através do Controlo de Qualidade HEMOCHRON para PRT.

	Nível 1				Nível 2			
R-PRT200	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Combinado	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Combinado
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Média	138	135	141	138	360	360	362	360
Desv. Pad.	2.5	2.3	4.0	3.7	6.1	2.1	7.6	5.1
CV%	1.8	1.7	2.9	2.7	1.7	0.6	2.1	1.4
R-PRT200K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Média	131	138	139	136	313	317	321	317
Desv. Pad.	2.5	8.5	5.1	6.5	2.3	2.0	3.6	4.3
CV%	1.9	6.2	3.7	4.8	0.7	0.6	1.1	1.4
R-PRT400	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Combinado	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Combinado
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Média	154	158	140	151	405	412	401	406
Desv. Pad.	6.1	2.6	2.1	9.1	8.5	10.4	3.2	8.3
CV%	4.0	1.7	1.5	6.0	2.1	2.5	0.8	2.0
R-PRT400K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Média	141	142	155	146	336	340	333	336
Desv. Pad.	2.1	7.6	5.0	3.7	9.0	12.7	8.5	9.3
CV%	1.5	5.4	3.2	2.7	2.7	3.7	2.6	2.8

Resultados da dosagem activada por caulino em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca tratados com aprotinina
Os dados clínicos foram recolhidos em dois locais, de acordo com aprovação institucional. Os cálculos das dosagens em cada local foram efectuados manualmente pelo médico especialista em transfusões sanguíneas que conduz os ensaios.

A eficácia das doses de PRT previstas é apresentada de forma resumida na tabela a seguir. A percentagem de pacientes a quem foram dadas as doses conforme quantificadas pelos testes PRT com caulino é mostrada sob o título "Dada dosagem recomendada".

Dosagem de Protamina

Local	Nº Pacientes	Dada Dosagem Recomendada #	(%)	Act Alvo	Pac. Que Atingem Alvo #	(%)	Dose Heparina (x 1000IU) Média ± DP	Intervalo
1	77	76	(99)	120	74	(97)	Não referida	
2	42	39	(86)	Linha De Base	30	(84)	194,4 ± 56,3	95 – 420

Estes dados reflectem a eficácia da dosagem do sistema com caulino na presença de aprotinina. Estão previstos intervalos posológicos amplos num estudo da população, devido à sensibilidade à heparina de cada paciente, duração do procedimento e dose total de heparina administrada durante o procedimento.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO
1. A precisão da previsão da dose de protamina depende da precisão do volume sanguíneo do paciente calculado. Em algumas ocasiões, as alterações do volume sanguíneo durante a cirurgia podem ser dramáticas, devido à infusão excessiva do fluido intravenoso, perda urinária, perda de sangue e transfusão do componente do sangue. Como acontece com qualquer infusão de medicação, o utilizador deve estar ciente destas alterações devido aos seus efeitos potenciais na eficácia da infusão da protamina.
2. A utilização de heparina adicional ou produtos de sangue heparinizado (ou seja, glóbulos vermelhos recuperados do sistema extracorporal) no seguimento do desempenho do ensaio PRT irá contradizer os resultados do teste e a previsão da protamina. Nesta circunstância, o ensaio PRT deve ser repetido para reflectir as necessidades adicionais de protamina. O paciente pós-cirúrgico deve ser monitorizado com o ACT e PDAO para se determinar a necessidade de infundir mais protamina para compensação do efeito da heparina latente, que pode possivelmente resultar no efeito "rebound" da heparina. [17] No caso de a adição da protamina não conseguir restaurar o ACT da linha de base, deve-se suspeitar de uma coagulopatia adquirida. O desempenho de um ACT e PDAO irá demonstrar a presença ou ausência de heparina e confirmar se uma porção adicional de protamina irá ajudar na restauração do ACT da linha de base.
3. O paciente com resistência à heparina requer grandes quantidades de heparina para prolongar o ACT. É possível que, se as concentrações de heparina forem extremamente elevadas, a representação gráfica do estado ACT e do PRT para determinação da resposta à protamina resulte numa "curva plana". Caso isto aconteça, surgirá no HEMOCHRON Modelo 8000 uma mensagem "Out of Range" (Fora do Intervalo), não sendo indicada uma dose recomendada para o PRT. Uma dose conservadora empírica preliminar de protamina é recomendada nestas circunstâncias. Após neutralização de uma percentagem da heparina com uma dose inicial, o PRT e o estado ACT podem ser repetidos para calcular a dose adequada para neutralizar com eficácia a restante heparina circulante.
4. Apenas os tubos activados com caulino (R-PRT200K ou R-PRT400K) devem ser usados em pacientes a receber aprotinina. Não foram efectuados estudos que utilizassem outros agentes antifibrinolíticos.
5. As análises *in vitro* indicaram uma elevação da dose de PRT prevista com concentrações de aprotinina superiores a 500 KIU/mL de sangue quando se utilizou o sistema activado com caulino.[15]
6. Os resultados do teste que não estão de acordo com os valores previstos devem ser verificados e posteriormente avaliados por meios de diagnóstico alternativos.

CONTROLO DE QUALIDADE (CQ)
A realização de testes de rotina de controlo de qualidade e de seguimento deverão fazer parte de um programa de garantia de qualidade abrangente. Estão disponíveis produtos de Controlo de Qualidade do Sistema de Coagulação de Sangue Total HEMOCHRON para tornar o CQ de rotina conveniente e acessível.

CQ Diário do Instrumento
Os instrumentos HEMOCHRON devem ser submetidos a controlo de qualidade em dois níveis de controlo uma vez em cada 8 horas de funcionamento. Para ajudar a efectuar o CQ diário, estão disponíveis Tubos de Verificação do Sistema Electrónico, que podem proporcionar verificações de controlo de qualidade em níveis múltiplos (normal e anormal) no instrumento. É também fornecido um Tubo de Verificação da Temperatura, para ser utilizado de seis em seis meses, para verificar se o instrumento mantém a temperatura adequada de 37°C ± 1°C. Quaisquer erros detectados no sistema de controlo da temperatura serão também indicados no ecrã LCD pelo instrumento.

CQ dos Tubos de Teste HEMOCHRON
Cada caixa de tubos teste HEMOCHRON deve ser validada pelo menos uma vez antes da sua utilização. Isto pode ser conseguido utilizando o Controlo de Qualidade Líquido HEMOCHRON adequado. Intervalos de desempenho aceitáveis para os tubos de teste estão incluídas com cada Kit de Produto de Controlo de Qualidade HEMOCHRON. Após cada caixa de tubos de teste ter sido verificada, a tabela "Desempenho Verificado", fornecida no painel lateral de cada caixa de tubos, deve ser preenchida. Esta caixa está agora "CONTROLADA" e não irá requerer outro controlo de qualidade líquido, salvo se ocorrer um desvio nos resultados clínicos.

NOTA: Se for recebida mais de uma caixa no mesmo envio, recomenda-se a validação de cada caixa antes da sua utilização.

BIBLIOGRAFIA

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass. J Extra-Corporeal Tech 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration. J Extra-Corporeal Tech 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay: A comparison of two methods. AMSECT Proceedings, March 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass. Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin. J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes. J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamine: A review of its toxicity. Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test. J Extra Corporeal Tech 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose. J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using *in vitro* heparin and protamine dosing assays. Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, May 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery: The *in vitro* effect of aprotinin. J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery: Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods. Perfusion 14: 181-7, 1999.

CE

HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Protamine Response Test (PRT)

Bijsluiter
Nederlands

BEOOGD GEBRUIK
De HEMOCHRON® PRT is bestemd voor het bepalen van de respons op het toedienen van een protamine dosis tijdens een *in vitro* diagnostische test. De HEMOCHRON PRT200 reageerbuis met perzikkleurige dop en de PRT400 reageerbuis met rode dop worden aanbevolen voor gebruik bij invasieve cardiologische interventies, waarbij protamine vereist is om de antistollende werking van heparine te neutraliseren. De kaoline-geactiveerde protamine respons tests kunnen ook gebruikt worden voor patiënten die met aprotinine worden behandeld. De PRT200 en PRT400 moeten volgens de opgestelde HEMOCHRON procedurele richtlijnen met de HEMOCHRON modellen 401, 801, 8000 en *Response* worden gebruikt.

Voor *in vitro* diagnostisch gebruik

SAMENVATTING EN TOELICHTING
De dosis protaminesulfaat die vereist is om heparine na een cardiopulmonale bypassoperatie te neutraliseren, is gewoonlijk gebaseerd op een hoeveelheid protamine afhankelijk van de via een infuus toegediende heparine tijdens de ingreep[1-3] of op titratie met protamine.[3,4]. Protocollen voor de titratie met protamine zijn ontwikkeld om de dosering van protamine meer nauwkeurig te kunnen bepalen dan uitsluitend op grond van empirische overwegingen.

Gezien de bekende complicaties die ontstaan door een overdosering van protamine of onvoldoende protamine, is het nauwkeurig bepalen van de protamine dosis van groot belang.[5-8] Een te lage dosis kan heparine-geïnduceerde bloedingen veroorzaken en suppletie van protamine vereisen. Een overdosering van protamine kan tot verhoogde protamine toxiciteit leiden. De observatie dat de neutraliserende werking van protamine varieert, afhankelijk van de fabrikant en het partijnummer, is van gelijkwaardig klinisch belang.[9] Het bewaken van de stollingsstatus van de patiënt tijdens een cardiopulmonale bypassoperatie is optimaal als deze protamine variabelen gecontroleerd worden.

Het doel van titratie met protamine is het bepalen van de juiste protamine dosis die vereist is om de circulerende heparine in patiënten volledig te neutraliseren. Titratie met protamine bestaat uit het bepalen van de stollingstijd van een gehepariniseerd bloedmonster waaraan een bekende hoeveelheid protamine werd toegevoegd. De *in vitro* neutralisatie van heparine door het toedienen van protamine correleert met de in vivo effecten van protamine.[10,11]

Protamine Response Test
De PRT kan samen met het door de apotheek van het ziekenhuis verstrekte injecteerbare protaminesulfaat worden uitgevoerd. Onderzoeken hebben aangetoond dat het gebruik van het RxDx-systeem optimale resultaten en verbeterde klinische uitslagen garandeert.[12,13,14]

Gegevens tonen aan dat het op deze manier uitvoeren van de PRT tijdens een *in vitro* test een nauwkeurige voorspelling van het in vivo respons op protamine mogelijk maakt.[15]

De PRT200 en PRT400 tests zijn verkrijgbaar met Celite® (diatomeeënaarde) of kaoline activators. De Celite-geactiveerde PRT is niet bestemd voor gebruik met de proteaseremmer aprotinine (Trasylol®, Bayer Corporation), die toegediend kan worden om postoperatieve bloedingen te reduceren, vooral tijdens cardiopulmonale bypassoperaties, en kan de Celite-geactiveerde PRT verlengen. Kaoline wordt niet beïnvloed door middelmatige aprotinine doseringen. De kaoline-geactiveerde PRT kan gebruikt worden voor het bepalen van de respons op de protamine dosis van patiënten die al dan niet met aprotinine worden behandeld.

De PRT wordt uitgevoerd met de HEMOCHRON volbloed coagulatie instrumenten, modellen 401, 801, 8000 of *Response*. De PRT bevat de reagentia die vereist zijn om de geactiveerde stollingstijd (ACT) te bepalen, alsmede een adequate concentratie van protamine. De PRT200 bevat 20 µg/mL protamine, een concentratie die overeenkomt met de gemiddelde protamine dosis die vereist is om de heparine na een cardiopulmonale bypassoperatie te neutraliseren. De PRT400 bevat 40 µg/mL protamine voor gebruik in gevallen waar hoge doseringen heparine nodig zijn.

In 1975 publiceerde Bull et al.11 de dosis-responscurve methode gebaseerd op de ACT voor patiëntspecifieke doseringen van heparine en protamine. Een titratie met protamine methode, met gebruik van de HEMOCHRON om de werking van de ACT te automatiseren, werd in 1983 beschreven.[4] De PRT is gebaseerd op het dosis-responscurve principe. Twee milliliter (2 mL) van het volbloed van patiënten wordt gebruikt om de stollingsstatus te bepalen en een PRT uit te voeren die 0,04 mg of 0,08 mg protamine bevat (afhankelijk van het type buis). Een patiëntspecifieke protamine respons wordt in een curve uitgezet. Op grond van deze resultaten en de gegevens van de patiënt[16] wordt bepaald welke protamine dosis in mg vereist is om de circulerende heparine te neutraliseren. De infuusdosis wordt automatisch berekend door de HEMOCHRON *Response* (software versie 2.0 of hoger) of 8000, of met de hand met behulp van het meegeleverde werkblad.

De neutralisatie van de heparine kan worden gecontroleerd door het meten van de geactiveerde stollingstijd en het uitvoeren van de PDA-0 (protamine dosis) test (oranje dop). Zie de bijsluiter van de PDA-0 voor informatie over deze procedure.

REAGENTIA
De HEMOCHRON PRT reageerbuizen zijn bestemd voor gebruik met vers volbloed. De reageerbuizen bevatten een gevriesdroogd preparaat van protaminesulfaat met toegevoegde activator, stabiliseringsmiddelen en buffers. De PRT200 en PRT400 reageerbuizen zijn voorzien van doppen met een kleurencode.
- Elke R-PRT200 buis (perzikkleurige dop) bevat protaminesulfaat (0,04 mg), diatomeeënaarde, stabiliseringsmiddelen en buffers.
- Elke R-PRT200K buis (perzikkleurige dop) bevat protaminesulfaat (0,04 mg), kaoline, stabiliseringsmiddelen en buffers.
- Elke R-PRT400 buis (rode dop) bevat protaminesulfaat (0,08 mg), diatomeeënaarde, stabiliseringsmiddelen en buffers.
- Elke R-PRT400K buis (rode dop) bevat protaminesulfaat (0,08 mg), kaoline, stabiliseringsmiddelen en buffers.

BEWAARCONDITIES EN STABILITEIT
De HEMOCHRON PRT-reageerbuizen moeten bij een gereguleerde kamertemperatuur (15 – 30°C) worden bewaard. De PRT-reageerbuizen zijn stabiel tot de vermelde houdbaarheidsdatum. Vermijd langdurige blootstelling van de PRT-kits aan temperaturen boven 30°C.

MONSTERAFNAME EN HANTERING
Verstrekt materiaal
- PRT200 reageerbuis (perzikkleurige dop; Celite- of kaoline-geactiveerd, waar van toepassing).
- PRT400 reageerbuis (rode dop; Celite- of kaoline-geactiveerd, waar van toepassing).
- PRT-werkblad (voor handmatige berekeningen, indien vereist).

Benodigd materiaal
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 of twee 401 modellen.
- Niet-gesiliconiseerde, niet-gehepariniseerde 5 mL opzuignaalden voor het afnemen van bloedmonsters.
- #20 lumen of grotere rechte transfernaald voor het pipetteren van het bloedmonster in de reageerbuis.
- ACT-reageerbuis: FTCA510 (zwarte dop) of FTK-ACT (gouden dop), waar van toepassing.

VOORZICHTIG Alle nodige voorzorgsmaatregelen nemen en de juiste bloedafname techniek met de spuiten toepassen om prikaccidenten te voorkomen.

Volg de juiste techniek (A of B) voor het afnemen van bloedmonsters.
A. Veneuze of arteriële bloedlijn met verblijfskatheter. (Neem geen bloed af uit een gehepariniseerde bloedlijn of een heparineslot in de verblijfskatheter.)
1. Vochtinfuus stopzetten, indien vereist.
2. Gebruik een dubbele spuittechniek. Neem 5 mL bloed af met twee opzuignaalden en werp de eerste spuit met bloed weg.
B. Extracorporale bloedlijn met poortkatheter.
1. Spoel de extracorporale bloedlijn uit door 5 mL bloed af te nemen en weg te werpen.
2. Neem 5 mL volbloed af met een 5 mL opzuignaald.

TESTPROCEDURE
Bij gebruik van de HEMOCHRON *Response* (softwareversie 2.0 of hoger) of 8000, berekent de systeemsoftware de protamine dosis op basis van de PRT200 of PRT400 testresultaten en de door de gebruiker verstrekte informatie, samen met de resultaten van het onderzoek naar de stollingsstatus.

Om te bepalen welke PRT-buis u dient te gebruiken bij gebruik van de HEMOCHRON *Response* (eerdere softwareversie dan 2.0), 401, 801 en het PRT-werkblad, dient u de volgende richtlijn te volgen.

PRT 200 (Perzikkleurige dop): het geschatte gehalte aan circulerende heparine van de patiënt op het moment van heparinereversie is minder dan 6,5 eenheden/mL.

PRT 400 (Rode dop): het geschatte gehalte aan circulerende heparine van de patiënt op het moment van heparinereversie is gelijk aan of groter dan 6,5 eenheden/mL.

OPMERKING Alhoewel deze richtlijn van toepassing is op de meeste patiënten, moet de test, in gevallen waar buitensporige doseringen zijn berekend, met de alternatieve buis worden herhaald om de dosis meer nauwkeurig te kunnen bepalen.

Bij het gebruik van Celite-geactiveerde PRTs moet een FTCA510 (zwarte dop) ACT worden gebruikt. Bij gebruik van kaoline-geactiveerde PRTs moet een FTK-ACT (gouden dop) worden gebruikt.

Aanbevolen protocol
1. Bepaal de baseline ACT vóór het neutraliseren van de heparine van de patiënt.
2. Voer tegelijkertijd een PRT en een stollingsstatus test uit zodra met het opwarmen van de patiënt wordt begonnen. Injecteer precies 2,0 mL bloed uit de opzuignaald in de PRT-reageerbuis. Druk tegelijkertijd op de START toets van de toepasselijke HEMOCHRON monsterkamer.
3. Schud de reageerbuis hierna onmiddellijk krachtig tien keer in de lengte.
4. Introduceer de PRT-reageerbuis in de toepasselijke monsterkamer. Roteer de reageerbuis snel naar rechts. Raadpleeg de gebruikershandleiding van het instrument voor aanvullende informatie.
5. Injecteer precies 2,0 mL bloed uit dezelfde spuit in de ACT-buis. Druk tegelijkertijd op de START toets van de toepasselijke HEMOCHRON monsterkamer.
6. Schud de reageerbuis hierna onmiddellijk tien keer krachtig in de lengte.
7. Plaats de ACT-reageerbuis in de toepasselijke HEMOCHRON monsterkamer. Roteer de reageerbuis snel naar rechts. Raadpleeg de gebruikershandleiding van het instrument voor aanvullende informatie.
8. Noteer het testresultaat zodra het signaal weerklinkt.
9. Bepaal de protamine infuusdosis. Zie de dosisberekeningen hieronder.

Dosisberekeningen
Raadpleeg de gebruikershandleiding van het HEMOCHRON *Response* RxDx voor uitvoerige instructies inzake het gebruik van het automatische berekeningssysteem bij gebruik van de HEMOCHRON *Response* (softwareversie 2.0 of hoger). Volg de instructies in de gebruikershandleiding van het instrument bij gebruik van de HEMOCHRON 8000. Volg, bij gebruik van de HEMOCHRON *Response* met eerdere softwareversies dan versie 2.0, HEMOCHRON 401 of 801, de instructies op het meegeleverde PRT-werkblad in deze kit om de protamine dosis te berekenen.

Berekenen van de circulerende heparine tijdens de procedure
Dit is mogelijk met behulp van de HEMOCHRON *Response* (softwareversie 2.0 of hoger) of 8000. Voer een PRT en een stollingsstatus test uit. Zoals gebruikelijk in andere *in vitro* testprocedures mogen de resultaten van de PRT nooit het klinisch oordeel van de behandelende arts vervangen.

GEBRUIKSWAARSCHUWINGEN
OPMERKING Neem te allen tijde algemene voorzorgsmaatregelen.
1. Het bloedmonster moet worden gepipetteerd met behulp van een geschikte transfernaald om de stop door te prikken.
2. Gebruik altijd twee handen om het bloed te pipetteren. Houd de buis met de ene hand stevig vast terwijl u het bloedmonster uit de opzuignaald in de buis injecteert.
3. De PRT-reageerbuizen zijn uit glas vervaardigd. Ze kunnen bij onoordeelkundig gebruik breken of barsten. Laat de reageerbuizen niet vallen en gooi niet met de buizen.
4. De PRT-reageerbuizen bevatten een deeltjesactivator (Celite of kaoline) en een materiaal van biologische oorsprong (protaminesulfaat). Het materiaal, de spuitbus niet hanteren of via de mond opnemen.
5. Alle gebruikte reageerbuizen die bloed van humane oorsprong bevatten, moeten worden weggeworpen in goedgekeurde afvalcontainers voor producten met biogevaar.
6. Verwijder de doppen niet om een bloedmonster te pipetteren.

PRESTATIEKENMERKEN
Het resultaat van de PRT is een aanduiding van het gehalte aan circulerende heparine van de individuele patiënt. Lage PRT-waarden indiceren de behoefte aan minder protamine om de heparine in de bloedstroom van de patiënt te neutraliseren. Gepubliceerde klinische rapporten hebben aangetoond dat de door de PRT aanbevolen protamine dosis vaak 15% tot 40% lager is dan een standaard empirische dosis (1 mg protamine/100 eenheden toegediende heparine). [12-15]

Nauwkeurigheid
De reproduceerbaarheid werd bepaald met behulp van de HEMOCHRON kwaliteitscontrole voor de PRT.

	Gehalte 1				Gehalte 2			
R-PRT200	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Gecombineerd	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Gecombineerd
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gemiddelde	138	135	141	138	360	360	362	360
Standaard-afwijking	2.5	2.3	4.0	3.7	6.1	2.1	7.6	5.1
VC in % (variatiecoëfficiënt)	1.8	1.7	2.9	2.7	1.7	0.6	2.1	1.4
R-PRT200K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gemiddelde	131	138	139	136	313	317	321	317
Standaard-afwijking	2.5	8.5	5.1	6.5	2.3	2.0	3.6	4.3
VC in %	1.9	6.2	3.7	4.8	0.7	0.6	1.1	1.4
R-PRT400	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Gecombineerd	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Gecombineerd
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gemiddelde	154	158	140	151	405	412	401	406
Standaard-afwijking	6.1	2.6	2.1	9.1	8.5	10.4	3.2	8.3
VC in %	4.0	1.7	1.5	6.0	2.1	2.5	0.8	2.0
R-PRT400K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gemiddelde	141	142	155	146	336	340	333	336
Standaard-afwijking	2.1	7.6	5.0	3.7	9.0	12.7	8.5	9.3
VC in %	1.5	5.4	3.2	2.7	2.7	3.7	2.6	2.8

Kaoline-geactiveerde doseringresultaten bij patiënten die een hartoperatie ondergaan en met aprotinine worden behandeld
De klinische gegevens werden, na institutionele goedkeuring, op twee locaties verzameld. op elke plaats werden de dosisberekeningen handmatig verricht door de perfusionist die de onderzoeken uitvoerde.

De doeltreffendheid van de door de PRT voorspelde doseringen is in de onderstaande tabel samengevat. Het aantal patiënten dat de door de PRT-testen bepaalde dosis kreeg toegediend, is vermeld onder het opschrift "Aanbevolen dosis".

Protamine dosis

Locatie	# Patiënten	Aanbevolen Dosis #	(%)	Act Richtwaarde	Door Patiënten Bereikte Richtwaarden #	(%)	Heparine Dosis (x 1000IU) Gemiddelde ± SD	Spreidingsbreedte
1	77	76	(99)	120	74	(97)	Niet vermeld	
2	42	39	(86)	Baseline	30	(84)	194,4 ± 56,3	95 – 420

Deze gegevens tonen de doeltreffende dosering door het kaoline systeem in de aanwezigheid van aprotinine. Grote verschillen in dosering worden verwacht in een populatieonderzoek als gevolg van de patiëntspecifieke gevoeligheid voor heparine, de lengte van de procedure en de totale heparinedosis die tijdens de procedure toegediend is toegediend.

BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE
1. De nauwkeurigheid van de voorspelde protamine dosis is afhankelijk van de nauwkeurigheid van het berekende bloedvolume van de patiënt. Als gevolg van buitensporige intraveneuze vochtinfusie, urineverlies, bloedverlies en de transfusie van bloedcomponenten kunnen in sommige gevallen tijdens de operatie ingrijpende veranderingen in het bloedvolume van patiënten plaatsvinden. Zoals bij alle via een infuus toegediende medicatie, moet de gebruiker rekening houden met deze veranderingen vanwege hun potentiële invloed op de doeltreffendheid van de protamine infusie.
2. Na het verrichten van de PRT doet het gebruik van aanvullende heparine of gehepariniseerde bloedproducten (d.w.z. teruggewonnen rode bloedcellen uit het extracorporale circuit) de testresultaten en de protamine voorspelling teniet. Om de behoefte aan aanvullende protamine te reflecteren, moet in het geval de PRT worden herhaald. Om de behoefte aan, via het infuus toegediende aanvullende protamine te bepalen (om te compenseren voor het latente heparine effect dat mogelijk tot een heparine reboundeffect kan leiden), moet de postoperatieve patiënt met behulp van het ACT en PDA-0 worden bewaakt.[17] Als de aanvullende protamine er niet in slaagt om de baseline ACT te herstellen, moet een verworven coagulopathie worden verondersteld. Het uitvoeren van een ACT en PDA-0 zal de aan- of afwezigheid van heparine aantonen en de hoeveelheid aanvullende protamine aangeven die de baseline ACT zal herstellen.
3. Heparine ongevoelige patiënten vereisen grote hoeveelheden heparine om het ACT te verlengen. Het is mogelijk dat, in het geval van uiterst hoge heparine concentraties, het uitzetten van de stollingsstatus, en het PRT om de protamine respons te bepalen, in een "platte curve" zal resulteren. Als dit plaats vindt, wordt er een "Out of Range" (buiten bereik) bericht weergegeven op het scherm van het HEMOCHRON model 8000 en wordt er geen aanbevolen dosis voor de PRT getoond. Een preoperatieve conservatieve empirische protamine dosis is in dit geval aanbevolen. Na het neutraliseren van een percentage van de heparine met een initiële dosis, kunnen, voor het berekenen van de adequate dosis om de resterende circulerende heparine te neutraliseren, de PRT en de stollingsstatus test worden herhaald.
4. Voor patiënten die met aprotinine worden behandeld, moeten uitsluitend kaoline-geactiveerde (R-PRT200K of R-PRT400K) reageerbuizen worden gebruikt. Er werden geen onderzoeken uitgevoerd waarbij andere antifibrinolytische stoffen werden gebruikt.
5. In vitro analyses hebben een verhoging van de door de PRT voorspelde dosis aangetoond, bij aprotinine concentraties hoger dan 500 KIU/mL bloed, bij het gebruik van kaoline-geactiveerde systemen.[15]
6. Testresultaten die niet overeenstemmen met de verwachte waarden moeten worden geverifieerd en hierna door alternatieve diagnostische middelen worden beoordeeld.

KWALITEITS-CONTROLE
Regelmatige kwaliteitscontroles moeten een integraal deel vormen van een uitgebreid kwaliteitszorgprogramma. HEMOCHRON volbloed coagulatiesysteem kwaliteitscontroleproducten zijn beschikbaar voor praktische en betaalbare routine kwaliteitscontroles.

Dagelijkse kwaliteitscontrole van het instrument
HEMOCHRON instrumenten moeten na elke acht bedrijfsuren op twee controleniveaus een kwaliteitscontrole ondergaan. Elektronisch systeem verificatiebuizen zijn beschikbaar voor het dagelijks uitvoeren van kwaliteitscontroles en kunnen op meerdere niveaus voorzien in kwaliteitscontroles van het instrument (normaal en abnormaal). Een temperatuur verificatiebuis wordt ook meegeleverd en moet elke 6 maanden worden gebruikt om te controleren of het instrument de juiste temperatuur van 37°C ± 1°C handhaaft. Fouten in het temperatuur controlesysteem worden door het instrument op het LCD-scherm weergegeven.

Kwaliteitscontrole van HEMOCHRON reageerbuizen
Elke doos met HEMOCHRON reageerbuizen moet tenminste één keer vóór het gebruik worden gecontroleerd. Dit kan worden uitgevoerd door het gebruik van de toepasselijke HEMOCHRON vloeistof kwaliteitscontrole. Elke HEMOCHRON kwaliteitscontrole productkit bevat het aanvaardbare prestatiebereik voor de reageerbuizen. Na het verifiëren van elke individuele doos met reageerbuizen, moet de "prestatiecontrole" tabel op de zijkant van elke doos met reageerbuizen worden ingevuld. Deze doos is nu "ONDER CONTROLE" en vereist geen verdere vloeistof kwaliteitscontrole, tenzij een verandering in de klinische resultaten wordt geconstateerd.

OPMERKING Als een verzending meerdere dozen omvat dan moet elke doos voor het gebruik worden gecontroleerd.

LITERATUUR

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass. J Extra-Corporeal Tech 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration. J Extra-Corporeal Tech 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay: A comparison of two methods. AMSECT Proceedings, March 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass. Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin. J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes. J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamine: A review of its toxicity. Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test. J Extra Corporeal Tech 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose. J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using *in vitro* heparin and protamine dosing assays. Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, May 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery: The *in vitro* effect of aprotinin. J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery: Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods. Perfusion 14: 181-7, 1999.

CE

HEMOCHRON®
Whole Blood Coagulation Systems

Protamin responstest (PRT)

Indlægsseddel
Dansk

BRUGSANVISNING
HEMOCHRON® PRT er fremstillet til *in vitro* diagnostisk protamin dosisresponsevaluering. HEMOCHRON PRT200 ferskenfarvet top og PRT400 rød top prøveglas anbefales til brug i invasive kardiologiske procedurer, der kræver protamin til neutralisering af heparin antikoagulation. De kaolin-aktiverede PRT analyser kan også anvendes til patienter, der modtager aprotinin. PRT200 og PRT400 skal anvendes sammen med fastlagte HEMOCHRON proceduremæssige retningslinjer med HEMOCHRON model 401, 801, 8000 og *Response*.

Til *in vitro* diagnostik brug

RESUME OG FORKLARING
Dosen af protaminsulfat, der skal anvendes for at neutralisere heparin efter kardiopulmonær bypass-kirurgi, er normalt baseret på et forhold af protamin til den mængde af heparin, der er indgivet under procedure[1-3], eller på protamintitrering.[3,4] Protokoller til udførelse af protamintitrering er indbefattet på grund af behovet for at bestemme protamindoserne mere præcist, end hvis det kun var baseret på empiriske overvejelser.

Nøjagtig bestemmelse af protamindosis kan være nyttig ved de kendte komplikationer, der er knyttet til for meget eller utilstrækkelig protamin.[5-8] Alt for lav dosis kan resultere i heparin-relateret blødning og kan kræve yderligere protamin. En alt for høj dosis af protamin kan resultere i øget protamin toksicitet. Ssamme kliniske signifikans har den observation, at heparin neutraliseringsstyrke af protamin varierer, afhængigt af producent og partinummer.[9] Håndteringen af koagulationstilstanden for kardiopulmonær bypass-kirurgi patienten optimeres, når disse protaminvariabler kontrolleres.

Formålet med protamintitrering er at bestemme den nøjagtige protamindosis, der kræves for at udføre neutral cirkulation af heparin i en given patient. Protamintitrering involverer udførelse af en koagulationstid på en blodprøve med heparin, hvortil en kendt mængde af protamin er blevet tilsat. In vitro protaminneutralisering af heparin korrelerer med in vivo-virkningerne af protamin.[10,11]

Protaminresponstest
PRT kan køres sammen med injicerbart protaminsulfat leveret af det enkelte hospitals apotek. Analyser har vist, at anvendelse af RxDx-systemet giver optimale resultater og forbedrede kliniske resultater.[12,13,14]

Data viser, at kørsel af PRT på denne måde giver mulighed for nøjagtig forudsigelse af in vivo-respons for protamin fra en *in vitro*-analyse.[15]

PRT200 og PRT400 tester er tilgængelige hos enten Celite® (diatoméjord) eller kaolin-aktivatorer. Celite-aktiveret PRT test er ikke beregnet til brug med protease inhibitor aprotinin (Trasylol®, Bayer Corporation), som kan indgives for at reducere post-operativ blødning, specielt under kardiopulmonær bypass-kirurgi, og kan forlænge den Celite-aktiverede PRT. Kaolin reagerer ikke ved moderat dosis aprotinin. Kaolin-aktiveret PRT kan anvendes til protamin dosisresponsevaluering hos patienter, uanset om de får aprotinin.

PRT udføres ved hjælp af HEMOCHRON Whole Blood Coagulation instrument model 401, 801, 8000 eller *Response*. PRT indeholder reagenser, der kræves til at udføre en Activated Clotting Time (ACT) samt en passende koncentration af protamin. PRT200 indeholder 20 µg/mL protamin, en koncentration, som svarer til en gennemsnitlig protamindosis, der er nødvendig for at neutralisere heparin ved afslutningen af bypass-kirurgi. PRT400 indeholder 40 µg/mL protamin til brug i tilfælde, der kræver store mængder heparin.

I 1975 publicerede Bull et al.[11] dosisresponskurvemetoden, der er baseret på ACT, til at individualisere heparin- og protamindoserne. En metode til protamintitrering ved hjælp af HEMOCHRON til automatisk udførelse af ACT, blev beskrevet i 1983.[4] PRT er baseret på dosisresponskurveprincippet. To milliliter (2 mL) patientfuldblod anvendes til at udføre en status-ACT og en PRT, som indeholder 0,04 mg eller 0,08 mg (afhængig af typen af glas) protamin. En protaminresponskurve opstilles for den enkelte patient. Ved at bruge disse resultater og patientdata[16] bestemmes den dosis protamin i mg, der kræves for at neutralisere det cirkulerende heparin. Infusionsdosen beregnes automatisk ved hjælp af HEMOCHRON *Response* (softwareversion 2.0 eller nyere) eller 8000, eller ved manuelt at bruge det medfølgende regneark.

Heparin-neutralisering kan verificeres ved at udføre en ACT og PDAO (orange top). Se indlægssedlen til PDAO angående oplysninger om denne procedure.

REAGENSER
HEMOCHRON PRT prøveglas er beregnet til brug med friskt fuldblod. Prøveglassene indeholder en klargjort frysetørret protaminsulfat med tilsat aktivator, stabilisatorer og pulverformer. PRT200 og PRT400 prøveglas er forsynet med farvekodede propper.
- Hvert R-PRT200 glas (ferskenfarvet top) indeholder protaminsulfat (0,04 mg), diatoméjord, stabilisatorer og pulverformer.
- Hvert R-PRT200K glas (ferskenfarvet top) indeholder protaminsulfat (0,04 mg), kaolin, stabilisatorer og pulverformer.
- Hvert R-PRT400 glas (rød top) indeholder protaminsulfat (0,08 mg), diatoméjord, stabilisatorer og pulverformer.
- Hvert R-PRT400K glas (rød top) indeholder protaminsulfat (0,08 mg), kaolin, stabilisatorer og pulverformer.

OPBEVARING OG STABILITET
HEMOCHRON PRT-glassene bør opbevares ved kontrolleret stuetemperatur (15 – 30°C). PRT-glassene er stabile indtil den anførte udløbsdato. Undgå at udsætte PRT-sættet for temperaturer over 30°C i længere tid ad gangen.

PRØVETAGNING OG HÅNDTERING
Medfølgende materiale
- PRT200-prøveglas (ferskenfarvet top; Celite eller kaolin-aktiveret, efter hvad der er relevant).
- PRT400-prøveglas (rød top; Celite eller kaolin-aktiveret, efter hvad der er relevant).
- PRT-regneark (til manuel beregning, efter ønske).

Materialekrav
- HEMOCHRON *Response*, 8000, 801 eller to 401.
- 5 mL sprøjter uden silikone og heparin til prøvetagning af blod.
- Nr20 mål eller større lige nål til overførsel af blodprøver til prøveglas.
- ACT-prøveglas: FTCA510 (sort top) eller FTK-ACT (guld top), efter hvad der er relevant.

Forsigtig: Enhver sikkerhedsforanstaltning skal tages ved at anvende korrekt metode med sprøjter for at undgå, at der sker uheld med nålestik.

Ved prøvetagning af blod skal den korrekte metode (A eller B) overholdes:
A. Indlægges i vene eller arteriel blodbane. (Hent ikke blod fra en slange til heparin eller indlagt heparinlås).
1. Afbryd væskedrop, hvis det er nødvendigt.
2. Når der anvendes en to-sprøjtemetode, skal der udtrækkes to 5 mL sprøjter, og den første sprøjte skal kasseres.
B. Ekstrakorporal blodbaneport.
1. Skyl den ekstrakorporale slange til blod ved at trække den tilbage og kassere 5 mL blod.
2. Træk 5 mL fuldblod ind i en 5 mL sprøjte.

TESTPROCEDURE
Hvis der anvendes HEMOCHRON *Response* (softwareversion 2.0 eller nyere) eller 8000, vil systemsoftwaren kvantificere protamindosen, baseret på prøveresultater for PRT200 eller PRT400 samt oplysninger, der er angivet af brugeren, sammen med status-ACT-resultaterne.

Hvis der anvendes HEMOCHRON *Response* (softwareversion tidligere end 2.0), 401, 801 og PRT beregningsregneark, skal følgende retningslinjer følges for at bestemme, hvilket PRT-glas der skal bruges:

PRT 200 (ferskenfarvet top): Patientens estimerede cirkulerende heparin-niveau på tidspunktet for tilbagetrækning er under 6,5 enheder/mL.

PRT 400 (rød top): - Patientens estimerede cirkulerende heparin-niveau på tidspunktet for tilbagetrækning er større eller lig med 6,5 enheder/mL.

BEMÆRK: Selvom disse retningslinjer er passende for de fleste patienter, kan gentagelse af prøvetagning med det alternative glas give en mere nøjagtig estimering af dosis i tilfælde, hvor der beregnes for store doser.

Hvis der anvendes Celite-aktiverede PRT-prøver, skal der bruges en FTCA510 (sort top) ACT. Hvis der anvendes kaolin-aktiveret PRT, skal der bruges en FTK-ACT (guld top).

Anbefalet protokol
1. Udfør basislinje-ACT, før heparin-nautralisering af patienten.
2. Når genopvarmning af patienten er begyndt, skal der samtidigt udføres en PRT-prøve og en status-ACT. Fra sprøjten til prøvetagning skal der dispenseres nøjagtig 2,0 mL blod i PRT-prøveglasset. Tryk samtidigt på knappen START til den relevante HEMOCHRON prøvebrønd.
3. Omryst straks prøveglasset kraftigt ved at vende det på hovedet ti gange.
4. Sæt PRT-prøveglasset i den relevante prøvebrønd. Roter hurtigt glasset med uret. Se den relevante brugervejledning til instrumentet angående yderligere oplysninger.
5. Fra den samme sprøjte til prøvetagning skal der dispenseres nøjagtig 2,0 mL blod i ACT-glasset. Tryk samtidigt på knappen START til den relevante HEMOCHRON prøvebrønd.
6. Omryst straks prøveglasset kraftigt ved at vende det på hovedet ti gange.
7. Sæt ACT-prøveglasset i den relevante HEMOCHRON prøvebrønd. Roter hurtigt glasset med uret. Se den relevante brugervejledning til instrumentet angående yderligere oplysninger.
8. Når indikatoren afgiver lyd, skal prøveresultatet registreres.
9. Bestem protamininfusionsdosen. Se dosisberegningerne nedenfor.

Dosisberegninger
Hvis der anvendes HEMOCHRON *Response* (softwareversion 2.0 eller nyere), henvises der til HEMOCHRON *Response* RxDx brugervejledningen angående detaljerede oplysninger om brug af det automatiserede beregningssystem. Hvis der anvendes HEMOCHRON 8000, skal vejledningerne i brugervejledningen til instrumentet følges. Hvis der anvendes HEMOCHRON *Response* med softwareversioner tidligere end 2.0, HEMOCHRON 401 eller 801, skal de medfølgende anvisninger til PRT-regnearket i dette sæt til beregning af protamindosis følges.

Beregning af cirkulerende heparin fremgangsmåde ved indgreb
Dette kan udføres ved hjælp af HEMOCHRON *Response* (softwareversion 2.0 eller nyere) eller 8000. Udfør en PRT og status-ACT. Som ved andre *in vitro* testprocedurer, bør PRT-resultatet aldrig erstatte den deltagende læges kliniske vurdering.

ADVARSEL VED BRUG AF PRODUKTET
BEMÆRK: Overhold altid de universelle sikkerhedsforanstaltninger.
1. Blodprøverne skal overføres med en relevant overførselsnål til at perforere proppen.
2. Brug altid en a to-håndsmetode til overførsel af blod. Den ene hånd holder fast på glasset, mens den anden hånd dispenserer blodprøven fra sprøjten.
3. PRT-prøveglassene er fremstillet af glas. De kan knække eller blive beskadiget, hvis de mishandles. Undgå at tabe eller kaste glassene.
4. PRT-prøveglassene indeholder en partikelaktivator (Celite eller kaolin) samt et materiale af biologisk oprindelse (protaminsulfat). Undgå at håndtere materialet, forstøve det eller indtage det.
5. Alle brugte prøveglas, der indeholder humant afledt blod, skal kasseres i relevante beholdere til biologiske produkter.
6. Fjern ikke propperne ved levering af en blodprøvetagning til glasset.

YDEEVNE
PRT resultatet er en indikator for det cirkulerende heparin-niveau hos den enkelte patient. Lavere PRT-værdier angiver behovet for mindre protamin til at neutralisere heparin i patientens blodbane. Publicerede kliniske rapporter har vist, at den anbefalede PRT protamindosis ofte er 15 % til 40 % lavere end en standard empirisk dosis (1 mg protamin/100 enheder indgivet heparin).[12-15]

Præcision
Reproducerbarhed blev bestemt ved hjælp af HEMOCHRON kvalitetskontrol for PRT.

	Niveau 1				Niveau 2			
R-PRT200	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Kombineret	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Kombineret
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gennemsnit	138	135	141	138	360	360	362	360
Std.afv	2.5	2.3	4.0	3.7	6.1	2.1	7.6	5.1
CV %	1.8	1.7	2.9	2.7	1.7	0.6	2.1	1.4
R-PRT200K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gennemsnit	131	138	139	136	313	317	321	317
Std.afv	2.5	8.5	5.1	6.5	2.3	2.0	3.6	4.3
CV %	1.9	6.2	3.7	4.8	0.7	0.6	1.1	1.4
R-PRT400	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Kombineret	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Kombineret
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gennemsnit	154	158	140	151	405	412	401	406
Std.afv	6.1	2.6	2.1	9.1	8.5	10.4	3.2	8.3
CV %	4.0	1.7	1.5	6.0	2.1	2.5	0.8	2.0
R-PRT400K								
N	3	3	3	9	3	3	3	9
Gennemsnit	141	142	155	146	336	340	333	336
Std.afv	2.1	7.6	5.0	3.7	9.0	12.7	8.5	9.3
CV %	1.5	5.4	3.2	2.7	2.7	3.7	2.6	2.8

Resultater fra kaolin-aktiveret dosering hos hjertekirurgiske patienter, der behandles med aprotinin
Kliniske data blev indsamLet to steder, efterfulgt af institutionel godkendelse. Doseringsberegning hvert sted blev udført manuelt af den person, der foretog perfusionen under kørsel af analyserne.

Effektiviteten af de PRT-beregnede doser opsummeres i tabellen nedenfor. Procentdelen af patienter, der fik dosen som kvantificeret af kaolin-PRT-prøveren, vises under overskriften "Doseret som anbefalet".

Dosering af protamin

Sted	Ant. Patienter	Doseret Som Anbefalet #	(%)	Mål Act	Pt.'s Opnåede Mål #	(%)	Heparindosis (x 1000IU) Middel ± SD	Område
1	77	76	(99)	120	74	(97)	Ikke Indrapporteret	
2	42	39	(86)	Basislinje	30	(84)	194,4 ± 56,3	95 – 420

Disse data afspejler dosiseffektiviteten for kaolin-systemet i det tilstedeværende aprotinin. Brede dosisområder må forventes i en befolkningsanalyse på grund af den enkelte patients modtagelighed for heparin, procedurens længde og den totale heparindosis, der blev givet gennem hele proceduren.

BEGRÆNSNINGER I PROCEDUREN
1. Nøjagtigheden af forudsigelsen for protamindosen afhænger af den nøjagtige beregning af patientens blodvolumen. I visse tilfælde er den ændring af blodvolumen, der sker under operation, drastisk på grund af for stor intravenøs væsketilførsel, tab af urin, blodtab og blodkomponenttransfusion. Som ved anden medicininfusion skal brugeren være opmærksom på disse ændringer på grund af deres potentielle virkninger på effektiviteten af protamininfusion.
2. Brug af ekstra heparin eller blodprodukter af heparin (f.eks. bevarede røde blodceller fra det ekstrakorporale system) efterfulgt af udførelsen af PRT-analysen vil ophæve testresultaterne og forudsigelsen af protamin. Under disse omstændigheder skal PRT-analysen gentages for at afspejle kravene for ekstra protamin. Den postoperative patient skal overvåges med ACT og PDAO for at bestemme behovet for yderligere infusion med protamin som kompensation for latent heparin-effekt, hvilket muligvis kan resultere i tilbageslag af heparin.[17] Hvis ekstra tilførsel af protamin ikke kan bevirke gendannelse af basislinje-ACT, bør en pådraget koagulationsdefekt mistænkes. Udførelsen af en ACT og PDAO vil vise tilstedeværelse eller fraværelse af heparin og bekræfte, om ekstra protamin vil hjælpe i gendannelse af basislinje-ACT eller ej.
3. Heparinresistente patienter kræver store mængder af heparin for at forlænge ACT. Det er muligt, hvis koncentrationerne af heparin er ekstrem høje, at plotte status-ACT og PRT ind for at bestemme, om protaminresponsen vil resultere i en "flad kurve". Hvis dette er tilfældet, vil en "Out of Range"-meddelelse blive vist på HEMOCHRON Model 8000, og der vises ikke en anbefalet dosis for PRT. En foreløbig konservativ empirisk dosis af protamin anbefales under sådanne omstændigheder. Efter neutralisering kan en procentdel af heparin med en indledende dosis, PRT og status-ACT gentages for at beregne den relevante dosis til effektiv neutralisering af den tilbageblivende cirkulerende heparin.
4. Kun kaolin-aktiverede (R-PRT200K eller R-PRT400K) glas må anvendes til patienter, der modtager aprotinin. Der er ikke foretaget analyser ved anvendelse af andre antifibronolytiske stoffer.
5. In vitro-analyser har vist en stigning af PRT-beregnet dosis ved koncentrationer af aprotinin, der overstiger 500 KIU/mL blod, når det kaolin-aktiverede system anvendes.[15]
6. De testresultater, der ikke stemmer overens med de forventede værdier, bør verificeres og derefter evalueres ved hjælp af andre diagnostiske metoder.

KVALITETSKONTROL (QC)
Rutinekvalitetskontrol og registrering bør være en del af et omfattende kvalitetssikringsprogram. HEMOCHRON Whole Blood Coagulation System kvalitetskontrolprodukter er tilgængelige og gør rutinemæssig QC praktisk og økonomisk overkommelig.

Daglig QC af instrumentet
HEMOCHRON instrumenter skal kvalitetskontrolleres på to niveauer for hver 8 timers brug. Som hjælp til daglig QC er elektronisk systemverificering af glas tilgængelig, så der kan foretages kvalitetskontrol af instrumentet på flere niveauer (normal og unormal). Et temperaturverificeringsglas findes også til brug hver sjette måned til at verificere, at instrumentet har den korrekte temperatur 37°C ± 1°C. Enhver fejl i temperaturkontrolsystemet vises også på instrumentets LCD-skærm.

QC af HEMOCHRON prøveglas
Alle kasser medHEMOCHRON prøveglas skal valideres mindst én gang før brug. Dette kan opnås ved at anvende den relevante HEMOCHRON flydende kvalitetskontrol. Acceptable ydelsesområder for prøveglassene findes i hvert produktsæt HEMOCHRON kvalitetskontrol. Når hver eneste kasse med prøveglas er verificeret, skal tabellen "Ydeevne verificeret", der findes på siden af hver kasse med prøveglas, udfyldes. Denne kasse er nu "UNDER KONTROL", og kræver ingen yderligere væskekvalitetskontrol, medmindre der konstateres en ændring i kliniske resultater.

BEMÆRK: Hvis flere kasser modtages i samme levering, anbefales det at validere hver kasse før brug.

REFERENCER

1. Friesen RH, Hydrick DR. Heparin reversal in children following cardiopulmonary bypass. J Extra-Corporeal Tech 18:95, 1986.
2. Kersting J, Rush B. A simple individualized method for dose-responsive heparin and protamine administration. J Extra-Corporeal Tech 11:56, 1979.
3. Rivard DC, Thompson SJ. Demonstration of heparin reversal with protamine administration using an automated protamine dose assay: A comparison of two methods. AMSECT Proceedings, Marts 11-14, 1988.
4. Dutton DA, Hothersall AP, McLaren AD, Taylor KM, Turner MA. Protamine titration after cardiopulmonary bypass. Anesthesia 38:264, 1983.
5. Fiser WP, Fewell JE, Hill DE, Barnes RW, Read RC. Cardiovascular effects of protamine sulfate are dependent on the presence and type of circulating heparin. J Thorac Cardiovasc Surg 89:63, 1985.
6. Frater RWM, Oka Y, Hong Y, Tsubo T, Loubser PG, Masone R. Protamine induced circulatory changes. J Thorac Cardiovasc Surg 87:687, 1984.
7. Horrow JC. Protamine: A review of its toxicity. Anesth Analg 64:348, 1985.
8. Sharath MD, Metzger WJ, Richerson HB, Scupham RK, Meng RL, Ginsberg BH, Weiler JM. Protamine-induced fatal anaphylaxis. J Thorac Cardiovasc Surg 90:86, 1985.
9. LaDuca F, Mills D, Thompson S, Larson K. Neutralization of heparin using a protamine titration assay and the activated clotting time test. J Extra Corporeal Tech 19:358, 1987.
10. Perkins HA, Osborn JJ, Hurt R, Gerbode F. Neutralization of heparin in vivo with protamine; A simple method of estimating the required dose. J Lab Clin Med 48:223, 1956.
11. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA. Heparin therapy during extracorporeal circulation II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. J Thorac Cardiovasc Surg 69:685, 1975.
12. Nyhan D, Thompson S, Harple M. Improved post-operating management following cardiopulmonary bypass using in vitro heparin and protamine dosing assays. Proc Soc of Cardiovasc Anes. Boston MA, Maj 1992.
13. De Laria GA, Tyner JJ, Hayes LL, Armstrong BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. Arch of Surgery 129:945, 1994.
14. Jobes DR, Aitken GL, Shaffer GW. Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. J. Thorac Cardiovasc Surg 110:36-45, 1995.
15. Zucker ML, Walker C, Jobes D, LaDuca FM. Comparison of celite kaolin based heparin and protamine dosing assays during cardiac surgery: The in vitro effect of aprotinin. J. Extra-Corp Tech 27:201-7, 1995.
16. Allen TH, Peng MT, Chen KP, Huang TF, Chang C, Fang HS. Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism 5:328-45, 1956.
17. LaDuca FM, Zucker ML, Walker CE. Assessing heparin neutralization following cardiac surgery: Sensitivity of thrombin time-based assays versus protamine titration methods. Perfusion 14: 181-7, 1999.