

INTENDED PURPOSE

The Helena BioSciences Thrombin Clotting Time Reagent contains bovine thrombin. The reagent can be used manually or on semi-automated and automated instruments. The test is commonly applied to detect various sources of interference with normal blood coagulation. Prolongation of the thrombin clotting time can be taken as a qualitative indication of abnormal fibrinogen levels (high or low), or the presence of interfering substances such as FDP's or heparin. Quantitative evaluation of the possible causes of prolonged thrombin clotting time should be performed as follow-up studies, such as aPTT or chromogenic assay for heparin, Clauss fibrinogen, FDP determinations, heparin neutralisation by protamine sulphate or polybrene, normal plasma mixing studies' or reptilase assay' to distinguish between hypofibrinogenaemia and FDP effects.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for in-vitro diagnostic use only - **DO NOT INGEST**. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheets for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HbsAg) HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody; however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

COMPOSITION

- Thrombin Clotting Time Reagent**
REF 5392 (10 x 2ml)
REF 5377 (10 x 5ml)
 Each vial contains a lyophilised preparation of bovine thrombin with buffers and stabilisers. The reconstituted reagent contains approximately 3NIH units/ml of thrombin. The reagent should be a white lyophilised plug.
Preparation: Reconstitute the reagent with the recommended volume of purified water (5ml for REF 5377 or 2ml for REF 5392). Allow to stand for 5 minutes then mix gently by inversion and transfer to a plastic tube. Reconstituted reagent should be a clear, colourless solution.
- Other kit components**
 Each kit contains Instructions For Use.

STORAGE AND SHELF LIFE

Unopened reagents are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.

- Thrombin Clotting Time Reagent**
 Reconstituted reagent should be stored at 2...6°C and is stable for 8 hours, AC-4 Pos 27 @ 37°C = 6hrs.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood (9 parts) should be collected into 3.2% or 3.8% sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 2000 - 3000 x g for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month. Thaw quickly at 37°C prior to testing. Do not keep at 37°C for more than 5 minutes.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

Any high quality electro-mechanical or photo-optical coagulation instrument capable of performing Thrombin Clotting Time testing may be used.

- Collect and prepare the blood sample according to the directions outlined in **SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION**.
- Reconstitute the control plasma according to the package insert provided with each control.
- Prepare the reagent for use in the procedure according to the reconstitution instructions in the **COMPOSITION** section.
- Perform all tests in duplicate. Calculate the mean clotting time of the duplicate determinations to the nearest 0.1 seconds. Individual values should be within ±5% of the mean value.

- Automated Methods, AC-4. (REF 5392 x400 samples, REF 5377 x1000 samples)**
 Refer to the appropriate AC-4 Operators Manual for detailed instructions. Prepare all reagents as instructed under 'composition'.

START =5s	METHOD =Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=100µL Pos=35 (CP)	Def. (DP) Vol=0µL	Plasma
INCUB =0s	MATH =lin	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL	
RUNTIME =120s	SENS =2	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=50µL Pos=27	

B. Manual Method

- Pipette 0,2ml of the patient plasma or control plasma into a reaction tube.
- Incubate at 37°C for 3 minutes.
- Pipette 0,1ml of Thrombin Clotting Time Reagent into the reaction tube containing patient or control plasma whilst simultaneously starting a timer.
- Record the time taken for clot formation to the nearest 0.1 second.

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program. Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, patient results should be considered invalid.

Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

REF 5186	Norm-Trol 1	(10 x 1ml)
REF 5187	Ab-Trol 2	(10 x 1ml)
REF 5183	Ab-Trol 3	(10 x 1ml)

REFERENCE VALUES

Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish it's own normal range.

INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the Thrombin Clotting Time test should be reported to the nearest 0.1 seconds. The normal range (usually the mean ±2 standard deviations) should be established by each laboratory. Results outside the normal range should be considered abnormal and follow-up testing performed.

LIMITATIONS

Expected values for the Thrombin Clotting Time test will vary from one laboratory to another depending on the technique used. The method of clot detection, temperature, pH, collection technique, type of anticoagulant and time and method of sample storage are all very important. Plasma sample collection and storage conditions should be standardised and carefully controlled. Unexpected results should be confirmed by additional testing. As well as the cause of elongated Thrombin Clotting Times indicated in the summary section, a recent report has suggested that many systemic amyloidosis patients with bleeding complications may have a circulating inhibitor which prolongs the Thrombin Clotting Time⁴. Also, therapeutic levels of heparin may entirely abolish clotting in the Thrombin Clotting Time test, although neutralisation with protamine sulphate or polybrene should correct the Thrombin Clotting Time¹.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Helena BioSciences or their representatives have determined the following performance characteristics:

Within assay reproducibility		
Clot Time (s) CV(%)	n	
12.5	1.43	10
Between assay reproducibility		
Clot Time (s) CV(%)	n	
12.5	1.29	10

BIBLIOGRAPHY

- Laposata et al. The Clinical Haemostasis Handbook, Yearbook Medical Publishers Inc., p219, 1989.
- Thompson, A.R. and Harker, L.A. Manual of Haemostasis and Thrombosis. 3rd Ed., F.A. Davis Co., p62, 1983.
- DeMott, W.R., in: Laboratory Test Handbook, 2nd Ed., Jacobs D.S. et al Eds., Lexi-Comp Inc., p432-433, 1990.
- Gastineau, D.A. et al. 'Inhibitor of the Thrombin Time in Systemic Amyloidosis: A Common Coagulation Abnormality' Blood, 1991, 77: 2637-2640.

UTILISATION

Le réactif Temps de thrombine Helena BioSciences contient de la thrombine bovine. Il est possible d'utiliser le réactif avec une méthode manuelle ou avec des instruments automatisés ou semi-automatisés. Il s'agit d'un test couramment réalisé pour détecter diverses sources d'interférence avec la coagulation sanguine normale. Un allongement du temps de thrombine constitue une indication qualitative de taux de fibrinogène anormaux (élevé ou faible) ou de la présence de substances interférentes comme les produits de dégradation de la fibrine (PDF) ou l'héparine. Il est nécessaire de réaliser une évaluation quantitative des causes potentielles de cet allongement en réalisant d'autres analyses: TCA ou dosage chromogénique pour l'héparine, méthode de Clauss pour le fibrinogène, déterminations des PDF, neutralisation de l'héparine par du sulfate de protamine ou du Polybrene, études de mélanges avec du plasma normal' ou détermination du temps de reptilase pour différencier une hypofibrinogénémie des effets des PDF.

PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. **NE PAS INGÉRER**. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination. Un dépistage des produits à base de plasma a été réalisé et a donné un résultat négatif (sauf indication contraire sur la boîte du kit ou sur le flacon) pour les antigènes de l'hépatite B (AgHBs), les anticorps anti VIH 1 et 2 et les anticorps anti VHC; il est malgré tout nécessaire de les manipuler avec les mêmes précautions que pour les échantillons de plasma humain.

COMPOSITION

- Réactif Temps de thrombine**
REF 5392 (10 x 2ml)
REF 5377 (10 x 5ml)
 Chaque flacon contient une préparation lyophilisée de thrombine bovine additionnée de tampons et de stabilisateurs. Le réactif reconstitué contient environ 3 unités NIH/ml de thrombine. Il se présente sous la forme d'un lyophilisat blanc.
Préparation : Reconstituer le réactif en ajoutant le volume indiqué d'eau distillée (5ml pour la REF. 5377 ou 2ml pour la REF 5392). Laisser reposer 5 minutes puis mélanger doucement par inversion et transférer dans un tube en plastique. Le réactif reconstitué est une solution transparente et incolore.
- Autres composants du kit**
 Chaque kit contient une fiche technique.

STOCKAGE ET CONSERVATION

Les flacons de réactif non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.

- Réactif Temps de thrombine**
 Une fois reconstitué, le réactif doit être conservé entre 2...6°C; il est stable 8 heures, AC-4 Pos 27 @ 37°C = 6hrs..

PRÉLEVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

Utiliser tout au long du prélèvement du plastique ou du verre siliconé. Mélanger 9 volumes de sang et 1 volume de citrate de sodium à 3,2% ou 3,8%. Séparer le plasma après centrifugation à 2000 - 3000 x g pendant 15 minutes. Conserver le plasma entre 2...6°C. L'analyse doit être terminée dans les 2 heures suivant le prélèvement de l'échantillon; sinon, il est possible de congeler le plasma 2 semaines à -20°C ou un mois à -70°C. Décongeler rapidement à 37°C avant de réaliser l'analyse. Ne pas laisser à 37°C plus de 5 minutes.

MÉTHODOLOGIE

Il est possible d'utiliser un instrument de coagulation électromécanique ou photo-optique de haute qualité servant à déterminer le temps de thrombine.

- Prélever et préparer l'échantillon de sang conformément aux instructions du paragraphe **PRÉLEVEMENTS DES ÉCHANTILLONS**.
- Reconstituer le plasma de contrôle en suivant les instructions de la notice fournie avec chaque contrôle.
- Préparer le réactif à utiliser dans la procédure en suivant les instructions de reconstitution du paragraphe **COMPOSITION**.
- Réaliser toutes les analyses en double. Calculer le temps moyen de coagulation des déterminations en arrondissant au dixième de seconde. Les valeurs individuelles doivent se situer dans une plage ±5% de la valeur moyenne.

- Méthodes automatisées, AC-4. (REF 5392 x400 échantillons, REF 5377 x1000 échantillons)**
 Se conformer au manuel d'utilisation de AC-4 correspondant pour avoir des instructions détaillées. Préparer tous les réactifs en suivant les indications du paragraphe **Composition**

START =5s	METHOD =Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=100µL Pos=35 (CP)	Def. (DP) Vol=0µL	Plasma
INCUB =0s	MATH =lin	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL	
RUNTIME =120s	SENS =2	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=50µL Pos=27	

B. Méthode manuelle

- Pipeter 0,2ml de plasma patient ou contrôle dans un tube à essai.
- Incuber 3 minutes à 37°C.
- Pipeter 0,1ml de réactif Temps de thrombine dans le tube à essai contenant le plasma patient ou contrôle et démarer à ce moment un chronomètre.
- Rel lever le temps de formation du caillot en arrondissant au dixième de seconde.

CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité. Les plasmas de contrôle, normaux et anormaux, doivent être testés avant chaque lot d'échantillons patients afin de s'assurer que l'instrument et l'opérateur offrent des performances satisfaisantes. Si les contrôles ne donnent pas les résultats prévus, les résultats du patient doivent être considérés comme non valables.

Helena BioSciences distribue les contrôles suivants à utiliser avec ce produit:

REF 5186	Norm-Trol 1	(10 x 1ml)
REF 5187	Ab-Trol 2	(10 x 1ml)
REF 5183	Ab-Trol 3	(10 x 1ml)

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les valeurs de référence peuvent varier d'un laboratoire à l'autre suivant les techniques et les systèmes utilisés. C'est pour cette raison qu'il appartient à chaque laboratoire de déterminer sa propre plage normale.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du temps de thrombine doivent être indiqués en arrondissant au dixième de seconde. La plage normale (en général écarts-types moyens ± 2) doit être déterminée par chaque laboratoire. Les résultats se situant hors de la plage normale doivent être considérés comme anormaux et il est nécessaire de réaliser des analyses plus approfondies.

LIMITES

Les valeurs prévues du temps de thrombine varient d'un laboratoire à l'autre suivant la technique utilisée. La méthode de détection du caillot, la température, le pH, la technique de prélèvement, le type d'anticoagulant et la durée et le mode de conservation de l'échantillon sont des paramètres très importants. Les conditions de prélèvement et de conservation de l'échantillon de plasma doivent être standardisées et soigneusement contrôlées. Tout résultat hors plage doit être confirmé par un test supplémentaire. Mis à part les causes de l'allongement du temps de thrombine indiquées dans le paragraphe d'introduction, une étude récente a suggéré que de nombreux patients souffrant d'une amylose systémique avec des complications hémorragiques ont un inhibiteur circulant qui prolonge le temps de thrombine⁴. En outre, un taux thérapeutique d'héparine risque d'annuler complètement la coagulation dans le test de détermination du temps de thrombine, même si une neutralisation avec du sulfate de protamine ou du Polybrene doit corriger le temps de thrombine¹.

PERFORMANCES

Helena BioSciences ou ses représentants ont déterminé les performances suivantes.

Reproductibilité intra-analyse		
Temps de coag. (s) CV(%)	n	
12,5	1,43	10
Reproductibilité inter-analyse		
Temps de coag. (s) CV(%)	n	
12,5	1,29	10

BIBLIOGRAPHIE

- Laposata et al., 'The Clinical Haemostasis Handbook', Yearbook Medical Publishers Inc., p. 219, 1989.
- Thompson, A. R. et Harker, L. A., 'Manual of Haemostasis and Thrombosis', 3e éd., F. A. Davis Co., p. 62, 1983.
- DeMott, W. R., in: Laboratory Test Handbook, 2e éd., Jacobs D. S. et al éd., Lexi-Comp Inc., p. 432-433, 1990.
- Gastineau, D. A. et al. 'Inhibitor of the Thrombin Time in Systemic Amyloidosis: A Common Coagulation Abnormality' Blood, 1991, 77 : 2637-2640.

ANWENDUNGSBEREICH

Das Helena BioSciences Reagenz für die Thrombingerinnungszeit enthält Rinder-Thrombin. Das Reagenz kann manuell oder in Verbindung mit halbautomatischen oder automatischen Geräten verwendet werden. Der Test wird allgemein zum Nachweis verschiedener Ursachen von Störungen in der normalen Blutgerinnung verwendet. Eine Verlängerung der Thrombingerinnungszeit kann als qualitativer Hinweis auf abnormale Fibrinogen-Werte (hoch oder niedrig) gelten, oder auf die Anwesenheit gerinnungshemmender Substanzen wie Fibrinogen-Abbauprodukte oder Heparin hindeuten. Quantitative Befundung möglicher Ursachen einer verlängerten Thrombingerinnungszeit sollte als Verlaufsstudie durchgeführt werden wie z. B. aPTT oder chromogener Heparin-Test, Fibrinogen-Bestimmung (Clauss), Bestimmung der Fibrinogen-Abbauprodukte (FDP), Heparin-Neutralisation mit Protamin-sulfat oder Polybrene, Mischtests mit Normalplasma' oder Reptilasetest', um zwischen Hypofibrinogämie und FDP-Effekten zu unterscheiden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Reagenzien dieses Kits sind nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. - **NICHT EINNEHMEN**. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Siehe die Sicherheitsdatenblätter mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschriften sowie Informationen zur Entsorgung. Die Plasmaprodukte sind mit negativem Befund auf Hepatitis B Antigen (HBsAg), HIV-1 und HIV-2 Antikörper und HCV-Antikörper getestet worden (wenn nicht auf Kit-Verpackung oder Fläschchen anders bezeichnet). Sie sollten trotzdem mit derselben Vorsicht wie humane Plasmaproben behandelt werden.

INHALT

- Thrombingerinnungszeit**
REF 5392 (10 x 2ml)
REF 5377 (10 x 5ml)
 Jedes Fläschchen enthält eine lyophilisierte Zubereitung von Rinder-Thrombin mit Puffern und Stabilisatoren. Das rekonstituierte Reagenz enthält ca. 3 NIH Einheiten/ml Thrombin. Das Reagenz sollte ein weißer lyophilisierter Pfropf sein.
Vorbereitung: Reagenz mit der empfohlenen Menge destilliertem Wasser (5ml REF. 5377 oder 2ml REF 5392) rekonstituiert werden. 5 Minuten stehen lassen, durch Umdrehen leicht mischen und in eine Plastikröhrchen überführen. Rekonstituiertes Reagenz sollte eine klare, farblose Flüssigkeit sein.
- Weitere Kit-Komponenten**
 Jedes Kit enthält eine Gebrauchsanweisung.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Ungeöffnete Reagenzien sind unter den auf Verpackung oder Fläschchen angegebenen Lagerbedingungen bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

- Thrombingerinnungszeit**
 Rekonstituiertes Reagenz sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist 8 Stunden stabil, AC-4 Pos 27 @ 37°C = 6hrs..

PROBENTNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Plastik oder Silikonglas verwenden. Blut (9 Teile) sollte in 3,2% oder 3,8% Natriumcitrat als Antikoagulant (1 Teil) entnommen werden. 15 Minuten bei 2000 - 3000g zentrifugieren und Plasma abpipettieren. Plasma bei 2...6°C lagern. Plasma sollte innerhalb von 2 Stunden verarbeitet werden oder kann tief gefroren bei -20°C 2 Wochen oder -70°C einen Monat gelagert werden. Vor dem Testen schnell bei 37°C auftauen. Nicht länger als 5 Minuten bei 37°C stehen lassen.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

Es kann jedes zur Durchführung der Thrombingerinnungszeit geeignete, qualitative hochwertige elektromechanische oder lichtoptische Gerät benutzt werden.

- Blutproben gemäß den Anweisungen in **PROBENTNAHME UND VORBEREITUNG** entnehmen und vorbereiten.
- Kontrollplasma nach beigefügter Gebrauchsanweisung rekonstituieren
- Test-Reagenz entsprechend der Rekonstitutionsanleitung in dem Abschnitt **INHALT** vorbereiten.
- Alle Tests im Doppelansatz durchführen. Den Mittelwert der Gerinnungszeit für die Doppelwerte bis auf 0,1 Sekunden berechnen. Die einzelnen Werte sollten sich innerhalb ±5% des Mittelwerts befinden.

- Automatisierte Methoden, AC-4. (REF 5392 x400 Proben, REF 5377 x1000 Proben)**
 Siehe Bedienungsanleitung des verwendeten Geräts für eine genaue Anleitung. Alle Reagenzien wie unter „Inhalt“ beschrieben vorbereiten.

START =5s	METHOD =Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=100µL Pos=35 (CP)	Def. (DP) Vol=0µL	Plasma
INCUB =0s	MATH =lin	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL	
RUNTIME =120s	SENS =2	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=50µL Pos=27	

B. Manuelle Methode

- 0,2ml Patienten- oder Kontrollplasma in jedes Röhrchen pipettieren.
- Bei 37°C 3 Minuten inkubieren.
- 0,1ml Thrombingerinnungszeit-Reagenz in jedes Röhrchen mit Patienten- oder Kontrollplasma pipettieren und gleichzeitig Stoppuhr starten.
- Die Zeit bis zur Gerinnselbildung bis auf 0,1 Sekunden genau stoppen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor muss für eine eigene Qualitätskontrolle sorgen. Vor jeder Testreihe mit Patientenproben müssen normale und pathologische Kontrollplasmen getestet werden, um eine zufrieden stellende Geräteleistung und Bedienung zu gewährleisten. Liegen die Kontrollen außerhalb des Normbereichs, sind die Patientenergebnisse nicht zu verwenden.

In Verbindung mit diesem Produkt bietet Helena BioSciences die folgenden Kontrollen an:

REF 5186	Norm-Trol 1	(10 x 1ml)
REF 5187	Ab-Trol 2	(10 x 1ml)
REF 5183	Ab-Trol 3	(10 x 1ml)

REFERENZWERTE

Referenzwerte können je nach Technik und verwendetem System von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Aus diesem Grund sollte jedes Labor seine eigenen Normalwertbereiche erstellen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Thrombingerinnungszeit sollte bis auf 0,1 Sekunden genau angegeben werden. Der Normalbereich (gewöhnlich der Mittelwert von ± 2 Standardabweichungen) sollte von jeden Labor erstellt werden. Ergebnisse außerhalb des Normalbereichs sind als pathologisch zu bewerten, die weitere Tests erforderlich machen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Normalwerte für die Thrombingerinnungszeit variieren je nach angewandeter Technik von Labor zu Labor. Sehr wichtig dafür sind: Methode der Gerinnselerkennung, Temperatur, pH, Entnahmeverfahren, das verwendete Antikoagulant und Dauer und Art der Probenlagerung. Die Entnahme und Lagerungsbedingungen der Plasmaproben sollten standardisiert sein und sorgfältig überprüft werden. Unerwartete Ergebnisse müssen durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Wie schon in der Zusammenfassung als Grund für eine verlängerte Thrombingerinnungszeit angedeutet hat ein neuerer Bericht darauf hingewiesen, dass viele systemische Amyloidose-Patienten mit Blutungsstörungen einen freien Hemmstoff im Blut besitzen, der die Thrombingerinnungszeit verlängert⁴. Therapeutische Heparin-Spiegel können dazu führen, dass die Thrombingerinnungszeit überhaupt nicht zur Gerinnselbildung führt. Neutralisation mit Protamin-sulfat oder Polybrene kann dabei abhelfen¹.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Folgenden Leistungseigenschaften sind von Helena BioSciences oder in ihrem Auftrag ermittelt worden:

Reproduzierbarkeit innerhalb des Tests		
Gerinnungszeit (s) VK (%)	n	
12.5	1.43	10
Reproduzierbarkeit zwischen den Tests		
Gerinnungszeit (s) VK (%)	n	
12.5	1.29	10

LITERATUR

- Laposata et al. The Clinical Haemostasis Handbook, Yearbook Medical Publishers Inc., p219, 1989.
- Thompson, A.R. and Harker, L.A. Manual of Haemostasis and Thrombosis. 3rd Ed., F.A. Davis Co., p62, 1983.
- DeMott, W.R., in: Laboratory Test Handbook, 2nd Ed., Jacobs D.S. et al Eds., Lexi-Comp Inc., p432-433, 1990.
- Gastineau, D.A. et al. 'Inhibitor of the Thrombin Time in Systemic Amyloidosis: A Common Coagulation Abnormality' Blood, 1991, 77: 2637-2640.

PRINCIPIO

Il reagente per la determinazione del tempo di trombina Helena BioSciences contiene trombina bovina. Questo reagente può essere utilizzato manualmente o con strumenti semiautomatici e automatici. Il test viene comunemente impiegato per rilevare varie fonti di interferenza con la normale coagulazione del sangue. Il prolungamento del tempo di trombina può essere considerato come indicazione qualitativa di livelli anormali di fibrinogeno (alti o bassi) oppure della presenza di sostanze interferenti come gli FDP o l'eparina. La valutazione quantitativa delle possibili cause di un tempo di trombina prolungato deve essere eseguita sotto forma di studi di follow-up, come il dosaggio dell'aPTT o il dosaggio cromogenico per l'eparina, il fibrinogeno con metodo Clauss, le determinazioni degli FDP, la neutralizzazione dell'eparina con protamina solfato o polibrene, gli studi sulla miscelazione di plasma normale o il dosaggio della reptilasi¹, per distinguere tra l'ipofibrinogenemia e gli effetti degli FDP.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro - **NON INGERIRE**. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

COMPOSIZIONE

- Reagente per la determinazione del tempo di trombina**
REF 5392 (10 x 2ml)
REF 5377 (10 x 5ml)

Ogni flacone contiene una preparazione liofilizzata di trombina bovina con tamponi e stabilizzatori. Il reagente ricostituito contiene approssimativamente 3NIH unità/ml di trombina. Il reagente deve apparire sotto forma di tappo liofilizzato di colore bianco. **Preparazione:** Ricostituire il reagente con il volume raccomandato di acqua distillata (5ml per REF 5377 o 2ml per REF 5392). Lasciare riposare per 5 minuti, quindi miscelare delicatamente per inversione e trasferire in una provetta in plastica. Il reagente ricostituito deve apparire sotto forma di soluzione incolore trasparente.

- Altri componenti del kit**
Ogni kit contiene un foglio procedurale.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I reagenti non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit.

- Reagente per la determinazione del tempo di trombina
Il reagente ricostituito deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile per 8 ore, AC-4 Pos 27 @ 37°C = 6hrs..

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro silicizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodio citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000 - 3000 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per 1 mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire il test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

PROCEDURA

È possibile utilizzare qualsiasi strumento di coagulazione elettromeccanico o foto-ottico al quale sia in grado di eseguire il test del tempo di trombina.

- Raccogliere e preparare il campione di sangue conformemente alle istruzioni riportate nel paragrafo RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.
- Ricostituire il plasma di controllo seguendo le indicazioni fornite nell'inserito contenuto nella confezione di ciascun controllo.
- Preparare il reagente da utilizzare nella procedura conformemente alle istruzioni di ricostituzione riportate nel paragrafo COMPOSIZIONE.
- Eseguire tutti i test per 2 volte. Calcolare il tempo di coagulazione medio per le ripetizioni del test con un'approssimazione a 0,1 secondi. I singoli valori devono rientrare in una tolleranza di ±5% rispetto al valore medio.

- Metodi automatici, AC4. (REF 5392 x400 campioni, REF 5377 x1000 campioni)**

Fare riferimento al manuale utente dello AC-4 appropriato per conoscere le istruzioni dettagliate. Preparare tutti i reagenti secondo le istruzioni riportate nel paragrafo COMPOSIZIONE.

START =5s	METHOD =Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=100µL Pos=35 (CP)	Def. (DP) Vol=0µL	Plasma
INCUB =0s	MATH =lin	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL	
RUNTIME =120s	SENS =2	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=50µL Pos=27	

- Metodo manuale**

- Pipettare 0,2ml di plasma del paziente o di plasma di controllo in una provetta di reazione.
- Incubare a 37°C per 3 minuti.
- Pipettare 0,1ml di reagente per la determinazione del tempo di trombina nella provetta di reazione contenente il plasma del paziente o il plasma di controllo, azionando contemporaneamente un timer.
- Registrare il tempo di formazione del coagulo con un'approssimazione a 0,1 secondi.

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmidi di controllo normali e anormali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

REF 5186 Norm-Trol 1 (10 x 1ml)
REF 5187 Ab-Trol 2 (10 x 1ml),
REF 5183 Ab-Trol 3 (10 x 1ml).

VALORI DIRIFERIMENTO

I valori di riferimento possono variare da un laboratorio all'altro in funzione delle tecniche e dei sistemi in uso. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati relativi al test del tempo di trombina devono essere indicati con un'approssimazione a 0,1 secondi. Il range normale (solitamente pari alla media ± 2 deviazioni standard) deve essere stabilito da ogni singolo laboratorio. I risultati che fuoriescono dal range normale devono essere considerati come anormali; si raccomanda pertanto di eseguire test di follow-up.

LIMITAZIONI

I valori previsti per il test di determinazione del tempo di trombina possono variare da un laboratorio all'altro in funzione della tecnica utilizzata. Il metodo di rilevamento del coagulo, la temperatura, il pH, la tecnica di raccolta, il tipo di anticoagulante, il tempo e il metodo di conservazione dei campioni sono elementi di estrema importanza. La raccolta dei campioni di plasma e le condizioni di conservazione devono essere standardizzate e controllate con particolare attenzione. I risultati imprevisti devono essere confermati eseguendo ulteriori test.

Oltre alla causa dei tempi di trombina prolungati indicata nel paragrafo riepilogativo, secondo un recente rapporto molti pazienti affetti da amiloidosi sistemica con complicanze emorragiche possono presentare un inibitore circolante, che prolunga il tempo di trombina⁴. Inoltre, i livelli terapeutici di eparina possono eliminare completamente la coagulazione nei test del tempo di trombina, sebbene la neutralizzazione con protamina solfato o polibrene dovrebbe correggere il tempo di trombina¹.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti.

Riproducibilità entro il dosaggio Tempo di coagulazione (sec.)	CV (%)	n	
12.5	1.43	10	
Riproducibilità tra i dosaggi Tempo di coagulazione (sec.)	CV (%)	n	
12.5	1.29	10	

BIBLIOGRAFIA

- Laposata et al. The Clinical Haemostasis Handbook, Yearbook Medical Publishers Inc., p219, 1989.
- Thompson, A.R. and Harker, L.A. Manual of Haemostasis and Thrombosis. 3rd Ed., F.A. Davis Co., p62, 1983.
- DeMott, W.R., in: Laboratory Test Handbook, 2nd Ed., Jacobs D.S. et al Eds., Lexi-Comp Inc., p432-433, 1990.
- Gastineau, D.A. et al. 'Inhibitor of the Thrombin Time in Systemic Amyloidosis: A Common Coagulation Abnormality' Blood, 1991, 77: 2637-2640.

USO PREVISTO

El reactivo de tiempo de coagulación de trombina de Helena BioSciences contiene trombina bovina. El reactivo puede usarse manualmente o en instrumentos semiautomatizados o automatizados. La prueba se aplica con frecuencia para detectar diversas interferencias con la coagulación sanguínea normal.

La prolongación del tiempo de coagulación de la trombina puede tomarse como una indicación cualitativa de niveles anormales de fibrinógeno (altos o bajos) o la presencia de sustancias que interfieren como los PDF o la heparina. La evaluación cuantitativa de las posibles causas de tiempo de coagulación de la trombina prolongado debe realizarse como estudios de seguimiento, como el TTPa o la valoración cromogénica de la heparina, el fibrinógeno de Clauss, las determinaciones de los PDF, la neutralización de la heparina por sulfato de protamina o polibreno¹, los estudios de mezcla de plasma normal² o el ensayo de la reptilasa³ para distinguir entre la hipofibrinogenemia y los efectos de los PDF.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico – **NO SE DEBEN INGERIR**. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

Los productos plasmáticos se han sometido a pruebas y han resultado negativos (a menos que se indique otra cosa en la caja del kit o en el vial) para la presencia de antígeno de la hepatitis B (HbsAg), anticuerpos de VIH 1 y 2 y anticuerpo del VHC; sin embargo, deben manipularse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

COMPOSICIÓN

- Reactivo del tiempo de coagulación de la trombina**
REF 5392 (10 x 2ml)
REF 5377 (10 x 5ml)

Cada vial contiene un preparado liofilizado de trombina bovina con tampones y estabilizadores. El reactivo reconstituido contiene aproximadamente 3 unidades del NIH/ml de trombina. El reactivo debe ser un taco liofilizado blanco.

Preparación: Reconstituya el reactivo con el volumen recomendado de agua destilada (5ml para el REF. 5377 o 2ml para el REF. 5392). Deje que reposen durante 5 minutos y luego, mezcle suavemente mediante inversión y transfiera a un tubo de plástico. El reactivo reconstituido debe ser una solución transparente, incolora.

- Otros componentes del kit**
Cada kit contiene instrucciones de uso.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

Los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada cuando se conservan en las condiciones indicadas en el vial o en la etiqueta del kit.

- Reactivo del tiempo de coagulación de la trombina
El reactivo reconstituido debe conservarse a 2...6°C y es estable durante 8 horas, AC-4 Pos 27 @ 37°C = 6hrs..

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Deben usarse siempre plástico o vidrio silicizado.

Debe recogerse sangre (9 partes) en el anticoagulante citrato sódico al 3,2% o al 3,8% (1 parte). Se separa el plasma después de la centrifugación a 2000 - 3000 xg durante 15 minutos.

El plasma debe conservarse a 2...6°C. Las pruebas deberían terminarse en 2 horas desde la recogida de las muestras o el plasma puede conservarse congelado a -20 °C durante 2 semanas o -70°C durante un mes. Descongelar rápidamente a 37°C antes de realizar la prueba. No conservar a 37°C durante más de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

Puede usarse cualquier instrumento de coagulación electromecánico o foto-óptico capaz de realizar pruebas de tiempo de coagulación de trombina.

- Recoja y prepare la muestra de sangre de acuerdo con las instrucciones esbozadas en RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.
- Reconstituya el plasma control de acuerdo con el prospecto incluido con cada control.
- Prepare el reactivo para su uso en el procedimiento de acuerdo con las instrucciones de reconstitución en la sección COMPOSICIÓN.
- Realice todas las pruebas por duplicado. Calcule el tiempo de coagulación medio de las determinaciones duplicadas hasta una exactitud de 0,1 segundos. Los valores individuales deben estar dentro de ±5% del valor medio.

- Métodos automatizados, AC-4. (REF 5392 x400 muestras, REF 5377 x1000 muestras)**

Consúltese el Manual del Operador del AC-4 adecuado para instrucciones detalladas. Preparar todos los reactivos como se indica en "composición"...

START =5s	METHOD =Coag	MIX=0	PATIENT (Pat) vol=100µL Pos=35 (CP)	Def. (DP) Vol=0µL	Plasma
INCUB =0s	MATH =lin	CLEAN=0	BUFFER (BUF) Vol=0µL	R1 Vol=0µL	
RUNTIME =120s	SENS =2	T-CORR=0 S-CORR=0	CLEAR (CLR) Vol=0µL	R2 Vol=50µL Pos=27	

- Método manual**

- Pipetee 0,2ml del plasma del paciente o el plasma control en un tubo de reacción.
- Incube a 37°C durante 3 minutos.
- Pipetee 0,1ml de reactivo de tiempo de coagulación de la trombina en el tubo de reacción que contiene plasma del paciente o control mientras se pone en marcha simultáneamente un temporizador.
- Registre el tiempo hasta la formación del coágulo procurando afinar en la décima de segundo más próxima.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer un programa de control de calidad. Los controles normales y anormales deben estudiarse antes de cada lote de muestras del paciente, para asegurar un funcionamiento adecuado del instrumento y el operador. Si los controles no se realizan como se esperaba, los resultados del paciente deben considerarse inválidos.

Helena BioSciences suministra los siguientes controles disponibles para usar con este producto:

REF 5186 Norm-Trol 1 (10 x 1 ml)
REF 5187 Ab-Trol 2 (10 x 1 ml),
REF 5183 Ab-Trol 3 (10 x 1 ml)

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden variar entre los laboratorios dependiendo de las técnicas y sistemas usados. Por esta razón, cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de la prueba de tiempo de coagulación de la trombina deben comunicarse en los 0,1 segundos más próximos. Cada laboratorio debe establecer el intervalo normal (habitualmente, la media ±2 desviaciones estándar).

Los resultados fuera del intervalo normal deben considerarse anormales y deben realizarse pruebas de seguimiento.

LIMITACIONES

Los valores esperados para la prueba del tiempo de coagulación de la trombina variarán de un laboratorio a otro dependiendo de la técnica usada. El método de detección de los coágulos,

la temperatura, el pH, la técnica de recogida, el tipo de anticoagulante y el tiempo y el método de almacenamiento de la muestra son todos muy importantes. Las condiciones de recogida y conservación de las muestras de plasma deben estandarizarse y controlarse cuidadosamente. Los resultados inesperados deben confirmarse mediante pruebas adicionales.

Además de la causa de alargamiento de los Tiempos de Coagulación de la trombina indicada en la sección resumen, un informe reciente ha sugerido que muchos pacientes con amiloidosis sistémica con complicaciones de sangrado pueden tener un inhibidor circulante que prolonga el tiempo de coagulación de la trombina⁴. Además, los niveles terapéuticos de heparina pueden abolir por completo la coagulación en la prueba del tiempo de coagulación de la trombina, aunque la neutralización con sulfato de protamina o polibreno debe corregir el tiempo de coagulación de la trombina¹.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Helena BioSciences o sus representantes han determinado las siguientes características de rendimiento:

Riproducibilidad dentro de cada ensayo Tiempo de coagulación (s) CV(%)	n	
12.5	1.43	10
Riproducibilidad entre distintos ensayos Tiempo de coagulación (s) CV(%)	n	
12.5	1.29	10

BIBLIOGRAFÍA

- Laposata et al. The Clinical Haemostasis Handbook, Yearbook Medical Publishers Inc., p219, 1989.
- Thompson, A.R. and Harker, L.A. Manual of Haemostasis and Thrombosis. 3rd Ed., F.A. Davis Co., p62, 1983.
- DeMott, W.R., in: Laboratory Test Handbook, 2nd Ed., Jacobs D.S. et al Eds., Lexi-Comp Inc., p432-433, 1990.
- Gastineau, D.A. et al. 'Inhibitor of the Thrombin Time in Systemic Amyloidosis: A Common Coagulation Abnormality' Blood, 1991, 77: 2637-2640.

Thrombin Clotting Time Reagent (TCT)

Instructions for use

REF 5377

REF 5392

Réactif Temps de thrombine (TT)

Fiche technique

Thrombingerinnungszeit (TZ)

Anleitung

Reagente per la determinazione del tempo di trombina (TT)

Istruzioni per l'uso

Reactivo del tiempo de coagulación de la trombina (TCT)

Instrucciones de uso

Helena Biosciences Europe

Queensway South

Team Valley Trading Estate

Gateshead

Tyne and Wear

NE11 0SD

Tel. +44 (0)191 482 8440

Fax +44 (0)191 482 8442

Email info@helena-biosciences.com

www.helena-biosciences.com

HL-2-0444P 2007/05 (7)