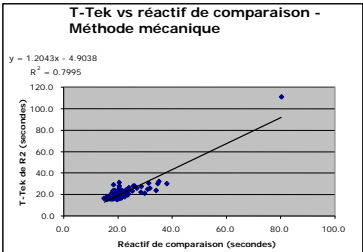


T –Tek

Thrombin Time Test



RÉFÉRENCES I. Clauss, A., Acta Haemat. 17:237-246, 1957

English Version

INTENDED USE

The **T-Tek** thrombin time reagent is intended for use in the quantitative determination of Thrombin Time (TT) in citrated human plasma in the general patient population. **T-Tek** should be used in the clinical laboratory by qualified laboratory professionals. The test may be performed using manual methods or semi-automated or automated coagulation analyzers.

SUMMARY

The active coagulation enzyme, thrombin, acts on soluble fibrinogen to convert it to insoluble fibrin. This reaction is manifested by the appearance of a visible fibrin clot (1).

Any substance that interferes with this reaction, i.e. heparin or fibrin degradation products, may produce a prolonged thrombin clotting time. Low plasma fibrinogen levels as well as abnormal fibrinogen molecules seen in severe liver disease or as congenital abnormalities will also prolong the clotting time.

PRINCIPLE

Thrombin solution is added to citrated plasma pre-warmed to 37°C and the time taken to detect the clot end point is noted.

REAGENTS

Warning: FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

Warning: POTENTIAL BIOHAZARD. The plasma used to prepare the thrombin reagent is of human origin and should be considered potentially infectious. The plasma was tested and found negative for Hepatitis B antigen (HBsAg) and antibodies to HIV and HCV by FDA licensed tests.

1. T-Tek Thrombin Reagent

Ingredients: Each vial of reagent contains a lyophilized preparation of human thrombin of approximately 10 NIH units per mL plus added stabilizers and buffers.

Preparation for User: Reconstitute each vial with 1 mL of distilled water as indicated on the vial. Swirl gently; do not shake. Allow to stand at room temperature for 10 minutes at room temperature before use.

Storage and Stability: The lyophilized product is stable until the expiration date printed on the vial, when stored at 2-8°C. After reconstitution, the reagent is stable at room temperature for up to 8 hours.

INSTRUMENTS OR TECHNIQUES

The thrombin time assay may be performed by accepted manual methods, or by using optical or electromechanical coagulation analyzers.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Specimen: Plasma obtained from whole blood anti-coagulated with 0.1 M sodium citrate.

Specimen Collection: One part of freshly collected whole blood should be immediately added to one part citrate anticoagulant and mixed thoroughly.

Specimen Preparation: Centrifuge the whole blood specimen at 2500 x g for 15 minutes (NCCLS H21-A2, 1991). Immediately separate the plasma from the red blood cells using a plastic pipette (if necessary) and place it in a plastic test tube.

Storage and Stability: Before and during testing the plasma sample should be maintained in plastic test tubes at 20 ± 5 °C to insure further stability. If testing is delayed for more than 8 hours, plasma may be stored at -20°C or below for up to one month. Frozen samples should be thawed rapidly at 37°C before testing.

TEST PROCEDURE

Reagents provided:

10 x 1 mL vials **T-Tek** Thrombin reagent

Reagents and equipment required but not provided:

- Purified water for reconstitution
- Stopwatch or timing device
- Reagent cups or 12 X 75 mm plastic test tubes
- Coagulation analyzer or 37°C water bath
- Variable volume pipettes (100 & 200 uL)
- Control Plasmas

Additional equipment and supplies available from r² Diagnostics:

- [PlasmaCon N](#)
- [PlasmaCon L-1](#)
- [PlasmaConL-2](#)

STEP-BY-STEP METHOD

The following is the manual method. Please refer to the User Manual for instructions if using an automated instrument.

All test tubes and pipette tips should be plastic.

- Reconstitute reagent as described.
- Reconstitute lyophilized plasma controls as directed. Collect and prepare the plasma sample specimen according to the directions outlined in the **SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION** section.
- To an instrument cuvette or test tube:

- Add 200uL control or patient plasma
- Incubate for 2 minutes at 37°C
- Add 200uL Thrombin reagent
- Start stopwatch
- Record clotting time from time

RESULTS

The clot times should fall within the laboratory’s normal range. If clot times are prolonged, the fibrinogen level or activity is low or thrombin inhibitors may be present.

QUALITY CONTROL

All coagulation testing should include adequate quality control testing to verify instrument and reagent performance. No patient results should be reported unless the QC controls are within their reference ranges.

LIMITATIONS

Significant levels of heparin, Fibrin(ogen) Degradation Products (FDP), or Direct Thrombin Inhibitors (DTI such as hirudin) in the patient plasma may give a prolonged time. Samples that are hemolyzed, icteric, or lipemic may also interfere with the assay especially on photo-optical instruments.

EXPECTED VALUES

The normal values obtained are instrument and technique dependent, and each laboratory should determine its own reference range. Patient results should fall within the reference range for that laboratory. The ranges supplied below were obtained from 120 normal donors.

Normal range (N = 120): 13-15 seconds (photo-optical)
16-18 seconds (mechanical)

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Precision

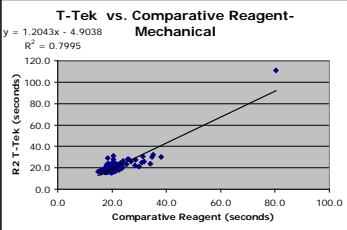
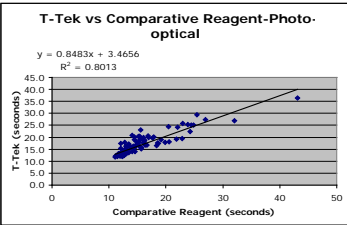
Precision studies were performed to establish Within Run and Between Run CV’s for normal and abnormal controls. Assays were performed using photo-optical and mechanical coagulation analyzers. Combined results are shown below.

<i>Normal</i>	<i>Within Run</i>	<i>Between Run</i>
n	40	20
Mean	16,4 seconds	16,9 seconds
SD	0,35 seconds	0,37 seconds
CV	2,25%	2,33%

<i>Abnormal</i>	<i>Within Run</i>	<i>Between Run</i>
n	40	20
Mean	20,5 seconds	20,4 seconds
SD	0,6 seconds	0,34 seconds
CV	3,0%	1,72%

2. Comparison

A comparison study was done using the T-Tek assay and a comparative method on at least 125 normal and abnormal frozen clinical samples using two different coagulation analyzer types. The linear regression equations and the coefficient of determination (r²) were as follows:



REFERENCES

- Clauss, A., Acta Haemat. 17:237-246, 1957

Version Francaise

APPLICATION

Le réactif du temps de thrombine **T-Tek** est conçu pour être utilisé aux fins de détermination quantitative du temps de thrombine (TT) dans du plasma humain cité au sein de la population de patients générale. **T-Tek** doit être utilisé en laboratoire clinique par des personnels de laboratoire qualifiés. Ce test peut être effectué à l'aide de méthodes manuelles ou d'analyseurs de coagulation automatisés ou semi-automatisés.

RÉSUMÉ

L'enzyme de coagulation active, la thrombine, agit sur le fibrinogène soluble pour le transformer en fibrine insoluble. Cette réaction se manifeste par l'apparition d'un caillot de fibrine visible (1).

Toute substance qui interfère avec cette réaction, à savoir l'héparine ou les produits de dégradation de la fibrine, peut prolonger le temps de coagulation de la thrombine. Un taux de fibrinogène plasmatique bas ainsi que les molécules de fibrinogène anormales observées dans les maladies hépatiques sévères ou les anomalies congénitales prolongent également de temps de coagulation.

PRINCIPLE

Une solution de thrombine est ajoutée au plasma citraté préchauffé à 37 °C et on note le temps mis à détecter le caillot.

RÉACTIFS

Avertissement : POUR UTILISATION DIAGNOSTIQUE IN VITRO UNIQUEMENT

Avertissement : RISQUE BIOLOGIQUE. Le plasma utilisé pour préparer le réactif thrombine est d'origine humaine et doit être considéré comme potentiellement infectieux. Le plasma a été testé et s'est avéré négatif à l'antigène de l'hépatite B (HBsAg) et aux anticorps anti-VHC et anti-VIH lors de l'utilisation de tests agréés par la FDA.

1. Réactif thrombine T-Tek

Ingredients : Chaque flacon de réactif contient une préparation lyophilisée de thrombine humaine d'environ 10 unités NIH par ml, ainsi que des stabilisateurs et des tampons.

Préparation avant utilisation : Reconstituer chaque flacon avec 1 ml d'eau distillée comme indiqué sur le flacon. Remuer doucement ; ne pas secouer.

Laisser reposer à température ambiante pendant 10 minutes avant utilisation. **Conservation et stabilité :** Le produit lyophilisé est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon, si il est conservé entre 2 et 8 °C. Après reconstitution, le réactif est stable à température ambiante pendant 8 heures maximum.

INSTRUMENTS OU TECHNIQUES

Le test du temps de thrombine peut être effectué soit par des méthodes manuelles acceptées, soit en utilisant des analyseurs de coagulation optiques ou électromécaniques.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Échantillon : Plasma obtenu à partir de sang total anticoagulé avec 0.1 M de citrate de sodium.

Prélèvement de l'échantillon : Ajouter le plus rapidement possible un volume de citrate à neuf volumes de sang total fraîchement prélevé, et mélanger de manière homogène.

Préparation de l'échantillon : Centrifuger l'échantillon de sang total à 2500 x g pendant 15 minutes (NCCLS H21-A2, 1991). Séparer immédiatement le plasma des globules rouges à l'aide d'une pipette en plastique (si nécessaire) et le déposer dans un tube à essai en plastique.

Conservation et stabilité : Avant et pendant l'analyse, l'échantillon de plasma doit demeurer dans des tubes à essai en plastique à 20 ± 5 °C afin de garantir sa stabilité. Si le test est retardé de plus de 8 heures, le plasma peut être conservé à -20 °C maximum pendant un mois au plus. Les échantillons congelés doivent être décongelés rapidement à 37 °C avant analyse.

PROCÉDURE D'ANALYSE

Réactifs fournis :

Réactif thrombine **T-Tek** en flacons de 1 ml (x 10)

Réactifs et équipements requis mais non fournis :

- Eau purifiée pour reconstitution
- Minuteur ou chronomètre
- Cuvettes à réactif ou tubes à essai en plastique (12 x 75 mm)
- Analyseur de coagulation ou bain-marie à 37 °C
- Pipettes à volume variable (100 et 200 µl)
- Plasmas de contrôle

Équipements et fournitures supplémentaires disponibles auprès de r² Diagnostics :

- [PlasmaCon N](#)
- [PlasmaCon L-1](#)
- [PlasmaConL-2](#)

PROCÉDURE ÉTAPE PAR ÉTAPE

La description suivante correspond à la méthode manuelle. Se reporter au manuel de l'utilisateur pour les instructions relatives aux instruments automatisés.

Tous les tubes à essai et embouts de pipette doivent être en plastique.

- Reconstituer le réactif comme indiqué.
- Reconstituer les plasmas de contrôle lyophilisés comme indiqué.

Prélever et préparer les échantillons de plasma conformément aux instructions figurant à la section PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.

3. Dans une cuvette de l'instrument ou un tube à essai :

- Ajouter 200 µl de plasma de contrôle ou de patient
- Incuber pendant 2 minutes à 37 °C
- Ajouter 200 µl de réactif thrombine
- Enclencher le minuteur
- Noter le temps de coagulation indiqué sur le chronomètre

RÉSULTATS

Les temps de coagulation doivent se situer dans la plage normale du laboratoire. Si les temps de coagulation sont trop longs, cela signifie que le taux de fibrinogène est bas ou que l'activité du fibrinogène est trop faible, ou que des inhibiteurs de la thrombine sont présents.

CONTRÔLE QUALITÉ

Tout test de coagulation doit inclure un test de contrôle qualité adéquat visant à vérifier les performances des instruments et des réactifs. Aucun résultat de patient ne doit être enregistré si les contrôles qualité ne se situent pas dans les plages de référence.

LIMITES

Des taux significatifs d'héparine, de produits de dégradation de la fibrine/du fibrinogène ou d'inhibiteurs directs de la thrombine (tels que l'hirudine) dans le plasma d'un patient peuvent prolonger le TT. Des échantillons hémolyés, icteriques ou lipémiques peuvent également interférer avec le test, en particulier sur les instruments photo-optiques.

VALEURS ATTENDUES

Les valeurs normales obtenues dépendent des instruments et des techniques, et chaque laboratoire doit déterminer sa propre plage de référence. Les résultats des patients doivent se situer dans la plage de référence du laboratoire concerné. Les plages fournies ci-dessous ont été obtenues avec des échantillons provenant de 120 donateurs sains.

Plage normale (N = 120) : 13-15 secondes (photo-optique)
16-18 secondes (mécanique)

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Précision

Des études de précision ont été réalisées pour déterminer les VC intracycle et inter-cycles pour les contrôles normaux et anormaux. Des tests ont été effectués à l'aide d'analyseurs de coagulation photo-optiques et mécaniques. Les résultats combinés sont indiqués ci-dessous.

<i>Normal</i>	<i>Intracycle</i>	<i>Inter-cycles</i>
N	40	20
Moyenne	16,4 secondes	16,9 secondes
ET	0,35 seconde	0,37 seconde
VC	2,25%	2,33%

<i>Anormal</i>	<i>Intracycle</i>	<i>Inter-cycles</i>
n	40	20
Moyenne	20,5 secondes	20,4 secondes
ET	0,6 seconde	0,34 seconde
VC	3,0 %	1,72 %

2. Comparison

A comparison study was done using the T-Tek assay and a comparative method on at least 125 normal and abnormal frozen clinical samples using two different coagulation analyzer types. The linear regression equations and the coefficient of determination (r²) were as follows:

