

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 Use: 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: Nine parts 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

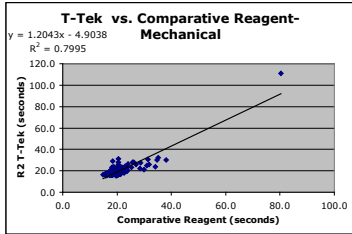
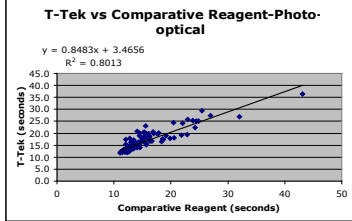
Precision studies were performed to establish Within Run and Between Run CV's for normal and abnormal controls. Assays were performed using photo-optical and mechanical coagulation analyzers. Combined results are shown below.

	<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

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

Ingrédients : 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, s'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.

T –Tek Thrombin Time Test

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

- 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 hémolyvés, 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 donneurs sains.

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

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Précision

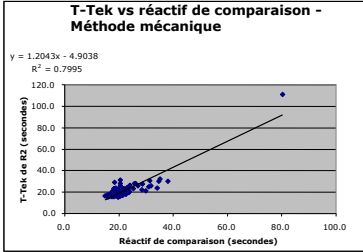
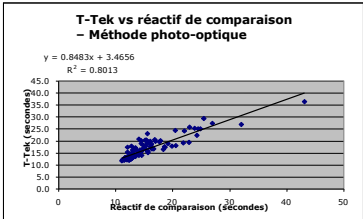
Des études de précision ont été réalisées pour déterminer les VC intracycle et inter-cycles pour les contrôles normaux et anormaux. Des tests ont été effectués à l'aide d'analyseurs de coagulation photo-optiques et mécaniques. Les résultats combinés sont indiqués ci-dessous.

	<i>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>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:



RÉFÉRENCES 1. Clauss, A., Acta Haemat. 17:237-246, 1957

Deutsche Version

VERWENDUNGSZWECK

Das **T-Tek**-Thrombinzeit-Reagenz ist für die quantitative Bestimmung der Thrombinzeit (TT) in zitriertem Humanplasma der allgemeinen Patientenpopulation bestimmt. **T-Tek** sollte im klinischen Labor von geschultem Laborpersonal verwendet werden. Die Durchführung des Tests kann unter Verwendung manueller Methoden oder halbautomatischer bzw. automatischer Gerinnungsanalysatoren erfolgen.

ZUSAMMENFASSUNG

Das aktive Blutgerinnungsenzym Thrombin verwandelt das lösliche Fibrinogen in unlösliches Fibrin. Diese Reaktion ist durch das Auftreten einer sichtbaren Fibringerinnung erkennbar (1). Wenn Substanzen, wie z.B. Heparin oder Fibrinolyseprodukte, in diese Reaktion eingreifen, kann es zu einer verlängerten Thrombin-Gerinnungszeit kommen. Zur Verlängerung der Gerinnungszeit führen außerdem niedrige Plasma-Fibrinogen-Spiegel sowie abweichende Fibrinogen-Moleküle bei ersten Leberkrankheiten oder bei angeborenen Gerinnungsstörungen.

PRINZIP

Thrombin-Lösung wird zu zitriertem, auf 37 °C vorgewärmtem Plasma hinzugegeben, und die Zeit bis zur Feststellung des Gerinnungsendpunktes wird bestimmt.

REAGENZIEEN

Warnung: NUR FÜR DIE IN VITRO DIAGNOSTIK

Warnung: POTENZIELLE BIOGefahr Das zur Herstellung des Thrombin-Reagenz verwendete Plasma ist humanen Ursprungs und sollte als potenziell infektiös angesehen werden. Das Plasma wurde untersucht und erwies sich in von der FDA zugelassenen Tests als Hepatitis B-Antigen (HBsAg)-negativ und HIV- und HCV-Antikörper-negativ.

1. T-Tek Thrombin-Reagenz

Zusammensetzung: Jedes Fläschchen Reagenz enthält lyophilisiertes Humanthrombin von etwa 10 NIH-e/mL sowie Stabilisatoren und Puffer. **Vorbereitung zum Gebrauch:** Jedes Fläschchen entsprechend den Angaben auf dem Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser rekonstituieren. Vorsichtig schwenken, nicht schütteln! Vor Gebrauch 10 Minuten bei Zimmertemperatur ruhen lassen.

Lagerung und Stabilität: Das lyophilisierte Produkt ist bei Lagerung bei 2 - 8 °C bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach der Rekonstitution ist das Reagenz bei Zimmertemperatur bis zu 8 Stunden stabil.

GERÄTE UND VERFAHREN

Zur Durchführung des Thrombinzeit-Assays können anerkannte manuelle Verfahren bzw. optische oder elektromechanische Gerinnungsanalysatoren verwendet werden.

PROBENTNAHME UND HANDHABUNG

Probe: Aus Vollblut gewonnenes Plasma, das mit 0,1 M Natriumcitrat anticoaguliert wurde.

Probenentnahme: Neun Teile frisch entnommenes Vollblut sollten sofort mit einem Teil zitriertem Antikoagulans versetzt und gründlich gemischt werden.

Probenvorbereitung: Vollblutprobe bei 2500 x g für 15 Minuten (CLS/NCCLS H21-A2, 1991) zentrifugieren. Mithilfe einer Plastikpipette (falls erforderlich) Plasma sofort von den roten Blutzellen trennen und in ein Plastikteströhrchen füllen.

Lagerung und Stabilität: Um zu gewährleisten, dass die Plasmaprobe stabil bleibt, sollte diese vor und während der Untersuchungen bei einer Temperatur von 20 ± 5 °C in Plastikteströhrchen aufbewahrt werden. Sollte sich die Testdurchführung um mehr als 8 Stunden verzögern, kann das Plasma bei einer Temperatur von oder unter -20 °C bis zu einem Monat lang aufbewahrt werden. Gefrorene Proben sind vor dem Testen schnell bei einer Temperatur von 37 °C aufzutauen.

TESTVERFAHREN

Im Packungsumfang enthaltene Reagenzien:

10 x 1 mL Fläschchen **T-Tek** Thrombin-Reagenz

Benötigte Reagenzien und Geräte, die nicht im Lieferumfang enthalten sind:

- Gereinigtes Wasser für die Rekonstitution
- Stopuhr oder anderes Zeitmessgerät
- Reagenzgefäße oder Plastikteströhrchen 12 x 75 mm
- Gerinnungsanalysator oder 37 °C Wasserbad
- Pipetten verschiedener Volumina (100 und 200 µL)
- Kontrollplasmen

Weitere von r² Diagnostics angebotene Ausrüstungen und Materialien:

PlasmaCon N
PlasmaCon L-1
PlasmaConL-2

STUFENWEISE METHODE

Nachfolgend ist die manuelle Methode dargestellt. Wenn ein automatisches Gerät verwendet wird, richten Sie sich nach den Anweisungen im Benutzerhandbuch.

Sämtliche Teströhrchen und Pipettenspitzen sollten aus Plastik bestehen.

- Reagenz nach Vorschrift rekonstituieren.
- Lyophilisierte Plasmakontrollen nach Anweisung rekonstituieren. Plasmaprobe in Übereinstimmung mit den Anweisungen in Abschnitt **PROBENTNAHME UND VORBEREITUNG** entnehmen und vorbereiten.
- Nehmen Sie eine Küvette oder ein Teströhrchen und:
 - Fügen Sie 200 µL Kontroll- oder Patientenplasma hinzu

- Inkubieren Sie für 2 Minuten bei 37 °C
- Fügen Sie 200 µL Thrombin-Reagenz hinzu
- Starten Sie die Stoppuhr
- Halten Sie die von der Stoppuhr angezeigte Gerinnungszeit fest

ERGEBNISSE

Die Gerinnungszeiten sollten sich innerhalb des normalen Bereiches für das Laboratorium befinden. Falls längere Gerinnungszeiten auftreten, kann das daran liegen, dass der Fibrinogen-Spiegel oder die Aktivität niedrig ist oder dass Thrombin-Hemmer anwesend sind.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei allen Gerinnungstests sollte eine angemessene Qualitätskontrolle durchgeführt werden, um die Leistungsfähigkeit der Geräte und Reagenzien zu überprüfen. Wenn die QK-Kontrollen sich nicht innerhalb des Bezugsbereiches befinden, sollten keine Patientenergebnisse berichtet werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

Signifikante Heparinspiegel, erhöhte Werte bei Fibrin(ogen)-Spaltprodukten (FDP) oder direkte Thrombin-Inhibitoren (DTI wie z.B. Hirudin) im Patientenplasma können zu längeren Zeiten führen. Hämolysierte, ikterische oder lipämische Proben können das Assay besonders bei der Verwendung photooptischer Geräte ebenfalls beeinträchtigen.

ZU ERWARTENDE WERTE

Die erhaltenen Normalwerte sind abhängig vom Gerät und vom angewendeten Verfahren. Daher sollte jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich festlegen. Die Patientenergebnisse sollten sich dann innerhalb des Referenzbereiches für das jeweilige Labor befinden. Die unten angegebenen Bereiche wurden von 120 normalen Spendern erfasst.

Normalbereich (N = 120): 13 - 15 Sekunden (photooptisch)
16 - 18 Sekunden (mechanisch)

LEISTUNGSMERKMALE

1. Präzision

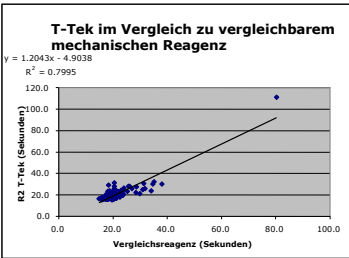
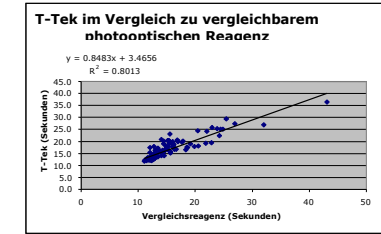
Es wurden Präzisionsstudien zur Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Varianzkoeffizienten für normale und pathologische Kontrollen durchgeführt. Bei der Durchführung der Assays wurden photooptische und mechanische Gerinnungsanalytoren verwendet. Die kombinierten Ergebnisse sind unten dargestellt.

<i>Normal</i>	<i>Intra-Assay</i>	<i>Inter-Assay</i>
N	40	20
Mittelwert	16,4 Sekunden	16,9 Sekunden
SD	0,35 Sekunden	0,37 Sekunden
VK	2,25%	2,33%

<i>Pathologisch</i>	<i>Intra-Assay</i>	<i>Inter-Assay</i>
N	40	20
Mittelwert	20,5 Sekunden	20,4 Sekunden
SD	0,6 Sekunden	0,34 Sekunden
VK	3,0 %	1,72 %

2. Vergleich

Unter Verwendung des T-Tek-Assays und einer vergleichbaren Methode wurde mit mindestens 125 normalen und pathologischen geforenen klinischen Proben mit 2 verschiedenen Arten von Gerinnungsanalytoren eine Vergleichsstudie durchgeführt. Die linearen Regressionsgleichungen und das Bestimmtheitsmaß (r^2) lauteten wie folgt:



LITERATURHINWEISE

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

L'utilizzo del reagente del tempo di trombina **T-Tek** è previsto nella determinazione quantitativa del Tempo di Trombina (TT) in plasma umano citrato nella popolazione generale dei pazienti. **T-Tek** deve essere utilizzato nel laboratorio clinico da personale di laboratorio qualificato. È possibile effettuare il test utilizzando metodi manuali o analizzatori di coagulazione semi-automatizzati o automatizzati.

RIASSUNTO

L'enzima di coagulazione attivo, la trombina, agisce sul fibrinogeno solubile per convertirlo in fibrina insolubile. Questa reazione si manifesta mediante la comparsa di un coagulo di fibrina visibile (1). Qualsiasi sostanza che interferisce con questa reazione, ovvero i prodotti del degrado di eparina o fibrina, può produrre un prolungamento del tempo di coagulazione della trombina. Anche i bassi livelli di fibrinogeno plasmatico e le molecole del fibrinogeno anormale rilevate in una grave epatopatia o in anomalie congenite produrranno un prolungamento del tempo di coagulazione.

PRINCIPIO

Si aggiunge soluzione di trombina al plasma citrato preriscaldato a 37°C e si annota il tempo necessario per rilevare il punto finale del coagulo.

REAGENTI

Attenzione: ESCLUSIVAMENTE PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Attenzione: POTENZIALE RISCHIO BIOLOGICO. Il plasma utilizzato per preparare il reagente trombina è di origine umana e deve essere considerato potenzialmente infettivo. È stato verificato che il plasma testato è negativo all'antigene dell'epatite B (HBsAg) e agli anticorpi ad HCV e HIV mediante test autorizzati dalla FDA.

1. Reagente trombina-T-Tek

Ingredienti: Ogni fiala di reagente contiene una preparazione liofilizzata di trombina umana di circa 10 unità NIH/mL con l'aggiunta di stabilizzatori e tamponi.

Preparazione per l'uso: Ricostituire ogni fiala con 1 mL di acqua distillata, come indicato sull'etichetta della fiala. Agitare delicatamente, non scuotere. Lasciar riposare a temperatura ambiente per 10 minuti prima dell'uso.

Conservazione e stabilità: Il prodotto liofilizzato è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla fiala, se conservato ad una temperatura di 2-8°C. Una volta ricostituito, il reagente è stabile a temperatura ambiente per un massimo di 8 ore.

STRUMENTI O TECNICHE

Il saggio del tempo di trombina può essere effettuato mediante metodi da manuale accettati, oppure utilizzando analizzatori di coagulazione ottici o elettromeccanici.

PRELIEVO E GESTIONE DEI CAMPIONI

Campione: Plasma ottenuto da sangue intero anticoagulato con 0,1 M di citrato di sodio.

Raccolta dei campioni: Nove parti di sangue intero appena prelevato devono essere aggiunte immediatamente ad una parte di anticoagulante citrato e miscelate con cura.

Preparazione del campione: Centrifugare il campione di sangue intero a 2500 x g per 15 minuti (NCCLS H21-A2, 1991). Separare immediatamente il plasma dai globuli rossi utilizzando una pipetta di plastica (se necessario) e trasferirlo in una provetta di plastica.

Conservazione e stabilità: Prima e durante i test occorre mantenere il campione di plasma nelle provette di plastica ad una temperatura di 20 ± 5 °C per garantire un'ulteriore stabilità. Se il test viene ritardato di più di 8 ore, è possibile conservare il plasma a una temperatura di -20°C o anche inferiore per un massimo di un mese. Prima del test, i campioni congelati devono essere scongelati rapidamente a 37°C.

PROCEDURA DEL TEST

Reagenti in dotazione:

10 fiale da 1 mL di reagente trombina **T-Tek**

Reagenti e apparecchiature necessari, ma non in dotazione:

1. Acqua depurata per ricostituzione
2. Cronografo o dispositivo per il cronometraggio
3. Recipienti per il reagente o 12 provette di plastica da 75 mL
4. Analizzatore di coagulazione o bagnomaria a 37°C
5. Pipette di volume variabile (100 e 200 µL)
6. Plasmidi di controllo

Ulteriori apparecchiature e forniture disponibili presso r² Diagnostics:

PlasmaCon N
PlasmaCon L-1
PlasmaCon L-2

METODO PASSO PASSO

Si riporta qui di seguito il metodo manuale. Consultare il manuale di istruzioni qualora si utilizzi uno strumento automatizzato.

Tutte le provette e le punte delle pipette devono essere in plastica.

1. Ricostituire il reagente come descritto.
2. Ricostituire i controlli di plasma liofilizzato secondo le istruzioni. Prelevare e preparare il campione di plasma seguendo le istruzioni contenute nella sezione **PRELIEVO E GESTIONE DEI CAMPIONI**.
3. In una cuvette o una provetta strumentale:
 - Aggiungere 200µL di plasma di controllo o paziente
 - Incubare per 2 minuti a 37°C
 - Aggiungere 200µL di reagente trombina
 - Avviare il cronografo

-Registrare il tempo di coagulazione leggendolo dal cronografo

RISULTATI

I tempi di coagulazione devono rientrare nel range di normalità del laboratorio. Se i tempi di coagulazione sono prolungati, è possibile che il livello o l'attività del fibrinogeno siano scarsi o che siano presenti inibitori della trombina.

CONTROLLO QUALITÀ

Tutte le verifiche della coagulazione devono comprendere un adeguato controllo della qualità per verificare le prestazioni di strumento e reagente. Non deve essere segnalato alcun risultato del paziente a meno che i controlli di qualità siano all'interno dei loro range di riferimento.

LIMITAZIONI

È possibile che livelli significativi di eparina, prodotti del degrado del fibrin(ogeno) (FDP) o inibitori diretti della trombina (DTI, ad esempio l'iridina) nel plasma del paziente si traducano in un prolungamento del tempo. Anche i campioni emolizzati, itterici o lipemici possono interferire con il saggio, soprattutto con strumenti foto-ottici.

VALORI ATTESI

I normali valori ottenuti dipendono dallo strumento e dalla tecnica e ogni laboratorio deve determinare il proprio range di riferimento. I risultati del paziente devono rientrare nel range di riferimento per quel laboratorio. I range forniti qui di seguito sono stati ottenuti da 120 donatori normali.

Range normale (N = 120): 13-15 secondi (foto-ottico)
16-18 secondi (meccanico)

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

1. Precisione

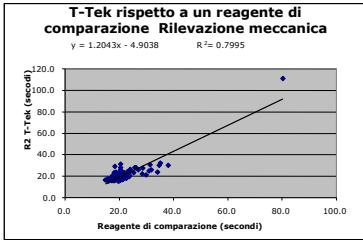
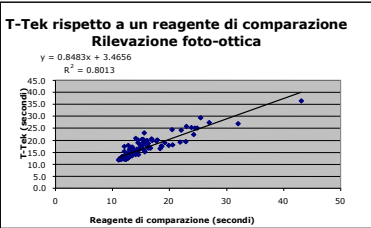
Sono stati condotti degli studi di precisione per stabilire i coefficienti di variazione (CV) intrasaggio ed intersaggio per controlli normali e anormali. Sono stati effettuati dei saggi utilizzando analizzatori di coagulazione foto-ottici e meccanici. I risultati combinati sono riportati qui di seguito.

2.

<i>Anormale</i>	<i>Intrasaggio</i>	<i>Intersaggio</i>
n	40	20
Medio	20,5 secondi	20,4 secondi
SD	0,6 secondi	0,34 secondi
CV	3,0%	1,72%

Comparazione

È stato condotto uno studio comparativo utilizzando il saggio T-Tek ed un metodo comparativo su almeno 125 campioni clinici normali e anormali congelati utilizzando due tipi diversi di analizzatore di coagulazione. Le equazioni di regressione lineare ed il coefficiente di determinazione (r^2) sono stati i seguenti:



BIBLIOGRAFIA

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

Version Española

USO PREVISTO

El reactivo de tiempo de trombina **T-Tek** está diseñado para su uso en la determinación cuantitativa del tiempo de trombina (TT) en plasma humano citratado de la población general de pacientes. **T-Tek** se debe utilizar en el laboratorio clínico por profesionales cualificados de laboratorio. La prueba se puede realizar mediante métodos manuales o analizadores de coagulación semiautomáticos o automáticos.

RESUMEN

La enzima de coagulación activa, la trombina, actúa sobre el fibrinógeno soluble para convertirlo en fibrina insoluble. Esta reacción se manifiesta con la aparición de un coágulo de fibrina visible (1). Cualquier sustancia que interfiera con esta reacción, como la heparina o los productos de degradación de la fibrina, puede generar un tiempo de coagulación de la trombina prolongado. Los niveles de fibrinógeno plasmático, así como las moléculas de fibrinógeno anormales que se presentan en hepatopatías graves o anomalías congénitas, también prolongarán el tiempo de coagulación.

PRINCIPIO

La solución de trombina se añade al plasma citratado precalentado a 37 °C y se anota el tiempo necesario para detectar el punto final de la coagulación.

REACTIVOS

Atención: DISEÑO ÚNICAMENTE PARA DIAGNÓSTICOS IN VITRO

Atención: RIESGO BIOLÓGICO POTENCIAL. El plasma utilizado para preparar el reactivo de trombina es de origen humano y se debe considerar potencialmente infeccioso. Se ha probado el plasma y se ha descubierto que resulta negativo para el antígeno de la hepatitis B (HBsAg) y para los anticuerpos del VIH y del VHC en las pruebas autorizadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA).

1. Reactivo de trombina T-Tek

Composición: Cada vial de reactivo contiene una preparación liofilizada de trombina humana de aproximadamente 10 unidades NIH/mL además de los estabilizadores y tampones añadidos.

Preparación para el uso: Reconstruya cada vial con 1 mL de agua destilada tal y como aparece en el vial. Remuévelo con suavidad, no lo agite. Deje reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de utilizarlo.

Almacenamiento y estabilidad: El producto liofilizado permanece estable hasta la fecha de caducidad impresa en el vial siempre que se almacene a 2-8 °C. Tras la reconstrucción, el reactivo permanece estable a temperatura ambiente hasta 8 horas.

INSTRUMENTOS O TÉCNICAS

El ensayo de tiempo de trombina se puede realizar siguiendo métodos manuales aceptados o mediante analizadores de coagulación ópticos o electromecánicos.

MANIPULACIÓN Y RECOGIDA DE LA MUESTRA

Muestra: Plasma obtenido a partir de sangre completa anticoagulada con citrato sódico de 0,1 M.

Recogida de la muestra: Deben añadirse inmediatamente nueve partes de sangre completa recién recogida a una parte de anticoagulante de citrato y mezclarse perfectamente.

Preparación de la muestra: Centrifugue la muestra de sangre completa a 2.500 xg durante 15 minutos (NCCLS H21-A2, 1991). Separe inmediatamente el plasma de los glóbulos rojos mediante una pipeta de plástico (si es necesario) y colóquelo en un tubo de ensayo de plástico.

Almacenamiento y estabilidad: Antes y durante las pruebas la muestra de plasma se debe mantener en tubos de ensayo de plástico a una temperatura de 20 ± 5 °C para asegurar su estabilidad. Si las pruebas se retrasan más de 8 horas, el plasma se puede almacenar hasta un mes a una temperatura de -20 °C o inferior. Las muestras congeladas deben descongelarse rápidamente a 37 °C antes de realizar las pruebas.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Reactivos incluidos:

Viales de reactivo de trombina **T-Tek** 10 x 1 mL

Reactivos y equipo necesarios no incluidos:

1. Agua purificada para la reconstrucción
2. Cronómetro o temporizador
3. Copas de reacción o tubos de ensayo de plástico 12 X 75 mm
4. Analizador de coagulación o baño de agua a 37 °C
5. Pipetas de volumen variable (100 y 200 µL)
6. Plasma de control

Equipo y material adicionales disponibles de r² Diagnostics:

PlasmaCon N
PlasmaCon L-1
PlasmaCon L-2

MÉTODO PASO A PASO

A continuación, se explica el método manual. Consulte el manual del usuario para obtener instrucciones si se va a utilizar un instrumento automático.

Todos los tubos de ensayo y las puntas de pipeta deben ser de plástico.

1. Reconstruya el reactivo tal y como se describe.
2. Reconstruya los controles de plasma liofilizado tal y como se describe. Extraiga y prepare la muestra de plasma siguiendo lo indicado en la sección **RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**.
3. Para una cubeta de instrumentos o tubo de ensayo:
 - Añada 200 µL de plasma de control o de paciente
 - Incube durante 2 minutos a 37 °C
 - Añada 200 µL de reactivo de trombina
 - Inicie el cronómetro
 - Registre el tiempo de coagulación que indica el cronómetro

RESULTADOS

Los tiempos de coagulación deben estar dentro del intervalo normal del laboratorio. Si los tiempos de coagulación son prolongados, el nivel o la actividad de fibrinógeno son bajos o puede que se encuentren presentes inhibidores de la trombina.

CONTROL DE CALIDAD

MT Promedt Consulting

GmbH

Ernst-Heckel-Straße 7, 66386

St. Ingbert, Germany

Todas las pruebas de coagulación deben incluir pruebas adecuadas de control de calidad para verificar el rendimiento del reactivo y el instrumento. No se deben registrar los resultados de paciente a menos que los controles de calidad estén dentro de sus intervalos de referencia.

LÍMITES

La presencia de niveles significativos de heparina, productos de degradación de la fibrina (fibrinógeno) (FDP) o inhibidores directos de la trombina (DTI), como la hirudina, en el plasma del paciente pueden dar como resultado un tiempo de coagulación prolongado. Las muestras hemolizadas, ictericas o lipémicas también pueden interferir en el ensayo, especialmente si se utilizan instrumentos fotoópticos.

VALORES ESPERADOS

Los valores normales obtenidos varían en función del instrumento y la técnica empleados, y cada laboratorio debe determinar su propio intervalo de referencia. Los resultados de paciente deben estar dentro del intervalo de referencia de dicho laboratorio. Los intervalos que aparecen se basan en una continuación se han obtenido de 120 donantes normales.

Intervalo normal (N = 120): 13-15 segundos (fotoóptico)
16-18 segundos (mecánico)

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1.

Precisión

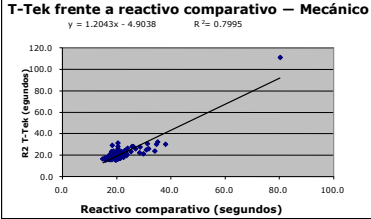
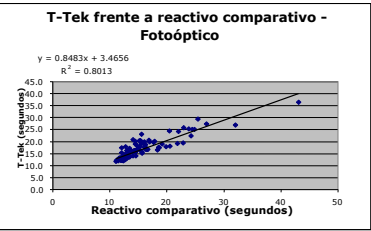
Se realizaron estudios de precisión para establecer los CV intraanálisis y entre análisis para los controles normales y anormales. Los ensayos se llevaron a cabo mediante analizadores de coagulación fotoópticos y mecánicos. Los resultados combinados se muestran a continuación.

<i>Normal</i>	<i>Intraanálisis</i>	<i>Entre análisis</i>
N	40	20
Medio	16,4 segundos	16,9 segundos
DT	0,35 segundo	0,37 segundos
CV	2,25%	2,33%

<i>Anormal</i>	<i>Intraanálisis</i>	<i>Entre análisis</i>
n	40	20
Medio	20,5 segundos	20,4 segundos
DT	0,6 segundos	0,34 segundos
CV	3,0%	1,72%

2. Comparación

Se realizó un estudio comparativo mediante el ensayo T-Tek y se utilizó un método comparativo sobre al menos 125 muestras clínicas normales y anormales congeladas utilizando dos tipos distintos de analizadores de coagulación. Las ecuaciones de la regresión lineal y el coeficiente de determinación (r^2) fueron los siguientes:



REFERENCIAS

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



R2 Diagnostics, Inc.

1801 Commerce Drive

South Bend, Indiana USA 46628

(574) 288-4377

www.r2diagnostics.com