

CE HEMOCLOT Thrombin time (T.T.)

ACK011K

Kit for the Thrombin Time determination on plasma

6 x 20 tests

ANIARA

Manufactured By: HYPHEN BioMed

For research use only

Last revision: 22/08/2006

METHOD:

Reagent for the determination of Thrombin Time (TT) on human citrated plasma, using a clotting method, which can be manual, semi-automatic or automatic.

ASSAY PRINCIPLE:

Measurement of the clotting time induced by bovine thrombin, in presence of calcium, on plasma, and exploration of the anti-thrombin activities.

Excellent sensitivity to low concentrations of heparin in plasma (from 0.05 to 0.10 IU/ml of Unfractionated Heparin (UFH), or from > 0.20 IU/ml Low Molecular Weight Heparin (LMWH) in plasma).

SPECIMEN:

Human plasma collected on citrate anticoagulant.

REAGENTS:

6 vials of highly purified **bovine Thrombin**, stabilised and lyophilised in presence of calcium.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- 100 µL Pipettes.
- Clotting instrument for semi-automatic or automatic coagulation assays, fibrometer or electromagnetic water bath.
- Distilled water
- Quality control plasmas.

PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS:

Unopened reagents, must be stored at 2–8 °C, in their original packaging box. They are then stable until the expiration date printed on the label.

Preparation: Calcium-Thrombin: each vial must be restored with 2 ml of distilled water, in order to obtain a Calcium-Thrombin solution, containing a concentration of about 1.0 NIH/ml of Calcium-Thrombin*, ready to use. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex). Incubate at room temperature (18-25°C) for 15 min, while shaking the vial from time to time. Homogenise the content before each use.

Stability of restored reagent:

This solution is stable, at least:

- 48 hours at room temperature
- 7 days at 2-8°C.

*The exact Thrombin concentration can vary from lot to lot and is adjusted for each lot in order to offer a high sensitivity Thrombin Time assay.

Note: The stability studies at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature without damage.

Note: Source bovine plasma used for the extraction of proteins included in the preparation of HEMOCLOT TT were tested with registered methods and found negative for bovine infectious diseases, notably for the bovine spongiform encephalopathy. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of bovine origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

ASSAY PROCEDURE:

Specimen collection:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma should be tested within 4 hours (or within 2 hours for plasmas from patients under heparin therapy) or stored frozen at –20°C or below for up to 1 month, and thawed for 15 min. at 37°C just before use.

Refer to GEHT or NCCLS guidelines for further instructions on specimen collection, handling and storage.

Tested plasma:

Plasma must be tested undiluted.

Assay protocol:

Manual Method:

Thrombin must be incubated at 37°C in its original vial or in a plastic tube.

In a test tube or in the reaction cuvette of the clotting instrument, introduce:

- 100 µl of citrated plasma
Incubate for 1 minute at 37°C, then introduce
- 100 µl of Calcium Thrombin, starting the stopwatch
Note exactly the clotting time.

Automatic Method:

Adaptations on the main coagulation analyzers are available upon request.

RESULTS AND USUAL VALUES:

As indicative values obtained on KC10 or STA, for normal plasmas, Thrombin Time is usually in the range:

15 sec. to 25 sec.

Thrombin time (TT) is abnormal if: **TT > 25 seconds.**

Each laboratory should establish its own usual range, which can vary according to the lot and instrument used.

ANIARA

8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

D.750.02/ACK/011K

QUALITY CONTROL:

Use of quality control plasmas allows validating an homogeneous reactivity from run to run, for a same lot of reagent.

The obtained clotting time for a same sample and a same reagent lot can vary according to the instrument used and the clot detection sensitivity adjustment.

Each laboratory should establish and validate its own usual range, mean and standard deviation, in its specific test conditions.

PROLONGED THROMBIN TIME AND CLINICAL INTEREST:

▪ A prolonged Thrombin Time (≥ 25 seconds) can result from:

- Presence of antithrombin activity induced by therapy (Heparin, hirudin).
- Presence of high concentrations of Fibrin/Fibrinogen degradation products.
- Qualitative (dysfibrinogenemia) or quantitative abnormalities of Fibrinogen (deficiency, DIC, fibrinolysis, hepatic disorders including cirrhosis).

▪ The Thrombin Time is normal in presence of a Factor XIII deficiency.

PERFORMANCES:

• As an example, the « usual TT range » has been determined for citrated normal human plasmas using:

Instrument	KC10	STA	Amax Destiny (mechanical)	Amax Destiny (optical)	ACL (research) (optical)
N	56	31	31	31	31
Mean TT (sec)	20.8	21.6	23.2	18.0	17.3
SD	1.7	1.8	1.7	1.6	1.2
Min-Max	16.9-24.5	17.0-25.8	20.9-26.9	15.8-21.6	15.4-20.3

(Using KC10, obtained TT was ≤ 22.5 seconds for $\approx 86\%$ of the plasmas).

• An excellent sensitivity is obtained to low concentrations of heparin present in the tested plasma (from 0.05 to 0.10 IU/ml of Unfractionated Heparin (UFH), and from 0.20 IU/ml Low Molecular Weight Heparin (LMWH)). As indicative values, the following TT (in seconds) were obtained on normal citrated human plasma, with addition of UFH or LMWH, using:

Instrument	KC10	STA	Amax Destiny (mechanical)	Amax Destiny (optical)	ACL (research) (optical)
Initial plasma	19.3	21.5	23.2	18.2	17.2
UFH 0.05 IU/ml	30.6	41.7	36.7	25.2	25.6
UFH 0.10 IU/ml	>120	>120	>120	>120	>120
LMWH 0.20 IU/ml	35.0	53.3	>120	32.1	29.1
LMWH 0.30 IU/ml	84.0	>120	>120	82	41.7

• Good sensitivity to hirudin, using KC10, from > 0.25 ATU/ml in plasma.

• Accuracy: as an example, the following results were obtained using KC10 instrument, on normal human plasma:

TT (sec)	N	Intra assay CV	N	Inter assay CV
21.6	10	1.8%	8	4.0 %

LIMITS:

- Various common substances or treatments can affect TT results. An additional investigation should be realized to determine the origin of each unexpected abnormal result.

- The obtained clotting time for a same sample and a same reagent lot can vary according to the instrument used and the clot detection sensitivity adjustment.

Each laboratory should establish and validate its own usual range, mean and standard deviation, in its specific test conditions.

In the same way, many variables (ex: different sources of heparin) can affect the obtained results: each laboratory should consequently establish its own heparin therapeutic range.

- Using the KC10 instrument, there was no significant interference up to <1 mg/ml purified fibrinogen degradation products (FDP), up to $<0,25$ mg/ml bilirubin, or up to $<2,5$ mg/ml haemoglobin added in plasma.

- Any sample presenting an abnormal aspect (ex: partial coagulation...) should be rejected.

REFERENCES:

Samama MM., Elalamy I., Conard J., Achkar A., Horellou MH., « Hémorragies et thromboses : du diagnostic au traitement », Paris : Masson, 15-16, 60, 2004.

CE HEMOCLOT Thrombin Time (T.T.)

Référence ACK011K
Coffret pour la détermination du temps de Thrombine
6 x 20 tests

Diagnostic *in vitro* exclusivement

MÉTHODE :

Réactif pour la détermination du temps de thrombine sur plasma humain citraté, par méthode coagulante, manuelle, semi-automatique ou automatique.

PRINCIPE :

Mesure du temps de coagulation induit par la thrombine bovine en présence de calcium, sur plasma, et mise en évidence des activités antithrombine.

Présente une excellente sensibilité à de faibles concentrations d'héparine présentes dans le plasma (à partir de 0,05 à 0,10 UI/ml d'héparine non fractionnée (HNF), et à partir de 0,20 UI/ml d'héparine de bas poids moléculaire (HBPM)).

ECHANTILLONS :

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.

REACTIFS :

6 flacons de **Thrombine Bovine** hautement purifiée, lyophilisée en présence de calcium.

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- Pipettes de 100 µL.
- Appareil de coagulation semi-automatique ou automatique, fibromètre ou Bain-Marie électromagnétique.
- Eau distillée.
- Plasmas de contrôle de qualité.

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

Préparation : Thrombine calcique : Chaque flacon doit être reconstitué par 2 ml d'eau distillée, afin d'obtenir une solution de Thrombine calcique*, titrant environ 1.0 NIH/ml, prête à l'emploi. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) pour une dissolution complète. Laisser stabiliser à température ambiante (18-25°C) pendant 15 min, en agitant de temps en temps. Bien homogénéiser avant toute utilisation.

Stabilité du réactif reconstitué :

Cette solution est stable au moins :

- 48 Heures à température de laboratoire (18-25°C)
- 7 jours à 2-8°C.

* La concentration exacte de la thrombine est ajustée pour chaque lot, afin d'apporter la meilleure sensibilité au test Temps de Thrombine.

ANIARA

Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 22/08/2006

Remarque : Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

Nota : Les plasmas bovins utilisés pour la purification des protéines rentrant dans la préparation du réactif HEMOCLOT TT ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts de toute trace de maladie infectieuse bovine, et notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109 M (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 4 heures (ou dans les 2 heures pour prélèvements de patients sous traitement héparine) ou conservé congelé, à -20°C au moins, jusqu'à 1 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C.

Se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons.

Plasma à tester :

Le plasma à tester est utilisé pur.

Protocole opératoire :

Méthode Manuelle :

Préincuber la thrombine à 37°C, dans son flacon d'origine ou en tube plastique.

Dans un tube à hémolyse ou une cupule réactionnelle de l'instrument de coagulation, introduire :

- 100 µl de plasma citraté
Incuber 1 minute à 37°C, puis ajouter
- 100 µl de Thrombine calcique
Noter très exactement le temps de coagulation.

Méthode automatique :

Pour les méthodes automatiques, les adaptations sur automates peuvent être fournies sur demande.

RESULTATS ET VALEURS USUELLES :

A titre indicatif, sur KC10 et STA, pour les plasmas normaux, les valeurs usuelles du Temps de Thrombine (TT) sont de :

15 à 25 sec.

Le Temps de Thrombine est anormal si : **TT > 25 secondes.**

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs usuelles, qui sont susceptibles de varier en fonction du lot et de l'instrument utilisé.

ANIARA

6560 Gove Court - Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

D.750.01/CK/011K

www.aniara.com

CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de plasmas de contrôle de qualité permet de valider la réactivité homogène de série à série, pour un même lot de réactif.

Le temps de coagulation obtenu pour un même échantillon et un même lot de réactif est susceptible de varier en fonction de l'instrument utilisé et de l'ajustement de la sensibilité de détection du caillot.

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir et valider ses propres zone usuelle, moyenne et écart type, dans ses conditions spécifiques de test.

ALLONGEMENT DU TEMPS DE THROMBINE ET INTERET CLINIQUE :

- L'allongement du Temps de Thrombine peut résulter de :
 - Présence d'activités "anti-thrombine" liées au traitement (Héparine, hirudine...).
 - Présence de fortes concentrations de produits de dégradation de la Fibrine ou du Fibrinogène.
 - Anomalies qualitatives (dysfibrinogénémie) ou quantitatives du Fibrinogène (déficit, CIVD, fibrinolyse, cirrhoses et hépatites graves).
- Le temps de thrombine est normal en présence d'un déficit en facteur XIII.

PERFORMANCES :

- A titre d'exemple, la « zone normale » de TT a été déterminée pour des plasmas humains citratés normaux sur :

	KC10	STA	Amax Destiny (mécanique)	Amax Destiny (optique)	ACL (recherche) (optique)
N	56	31	31	31	31
TT moyen (sec)	20,8	21,6	23,2	18,0	17,3
ET	1,7	1,8	1,7	1,6	1,2
Min-Max	16,9-24,5	17,0-25,8	20,9-26,9	15,8-21,6	15,4-20,3

(Au KC10, pour ≈ 86% de ces plasmas, le TT a été obtenu ≤ 22,5 secondes).

- Le réactif présente une excellente sensibilité à de faibles concentrations d'héparine présentes dans le plasma (à partir de 0,05 à 0,10 UI/ml d'héparine non fractionnée (HNF), et à partir de 0,20 UI/ml d'héparine de bas poids moléculaire (HBPM)). A titre d'exemple, les valeurs suivantes de TT (en secondes) ont été déterminées sur plasma humain citraté normal surchargé en HNF ou HBPM sur :

Instrument	KC10	STA	Amax Destiny (mécanique)	Amax Destiny (optique)	ACL (recherche) (optique)
Plasma initial	19,3	21,5	23,2	18,2	17,2
HNF 0,05 UI/ml	30,6	41,7	36,7	25,2	25,6
HNF 0,10 UI/ml	>120	>120	>120	>120	>120
HBPM 0,20 UI/ml	35,0	53,3	>120	32,1	29,1
HBPM 0,30 UI/ml	84,0	>120	>120	82	41,7

- Bonne sensibilité à l'hirudine, obtenue sur KC10, à partir de 0.25 ATU/ml.
- Précision : à titre d'exemple, les résultats suivants ont été obtenus au KC10 sur plasma normal :

TT (sec)	N	CV intra essai	N	CV inter essais
21,6	10	1,8%	8	4,0 %

LIMITES :

- Les résultats du test (TT) peuvent être affectés par de nombreuses substances ou traitements usuels. Une investigation complémentaire devra être réalisée afin de déterminer l'origine de tout résultat anormal ou inattendu.

- Le temps de coagulation obtenu pour un même échantillon et un même lot de réactifs est susceptible de varier en fonction de l'instrument utilisé et de l'ajustement de la sensibilité de détection du caillot.

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir et valider ses propres zone usuelle, moyenne et écart type, dans ses conditions spécifiques de test.

De même, de nombreuses variables (ex : différentes sources d'héparine) peuvent affecter les résultats obtenus. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir sa propre zone thérapeutique d'héparine.

- Au KC10, aucune interférence significative n'a été observée en présence de produits purifiés de dégradation du fibrinogène (PDF) <1mg/ml, de bilirubine <0,25 mg/ml, ou d'hémoglobine <2,5 mg/ml ajoutés dans le plasma.

- Tout prélèvement présentant un aspect anormal (coagulation partielle...) devra être rejeté.

REFERENCES :

Samama MM., Elalamy I., Conard J., Achkar A., Horellou MH., « Hémorragies et thromboses : du diagnostic au traitement », Paris : Masson, 15-16, 60, 2004.