

**HEMOCLOT™ Thrombin Time (T.T.)**

REF CK011K R 6 x 2 mL

REF CK011L R 6 x 8 mL



Méthode coagulante pour la détermination du Temps de Thrombine

Français, dernière révision : 02-2022

**UTILISATION :**

Le coffret HEMOCLOT™ Thrombin Time (T.T.) est une méthode coagulante pour la détermination quantitative *in vitro* du temps de thrombine sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée.

**RÉSUMÉ ET EXPLICATION :****Technique :**

Le temps de thrombine est un test de coagulation mesurant le temps pour convertir le fibrinogène en fibrine.

**Clinique :<sup>1</sup>**

Le temps de thrombine est un test de dépistage visant à évaluer les anomalies du fibrinogène et à détecter les inhibiteurs de la thrombine ou de la fibrine. Il peut être utile pour évaluer la Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD) et les pathologies hépatiques.

L'allongement du Temps de Thrombine peut résulter de :

- Présence d'activités "anti-thrombine" induites par traitement (ex : Héparine, hirudine, argatroban, dabigatran).
- Présence de fortes concentrations de produits de dégradation de la Fibrine/Fibrinogène.
- Anomalies qualitatives (dysfibrinogénémie) ou quantitatives du Fibrinogène (déficit, CIVD, fibrinolyse, pathologies hépatiques dont cirrhoses).

Le temps de thrombine est normal en présence d'un déficit en Facteur XIII.

**PRINCIPE :**

Le coffret HEMOCLOT™ Thrombin Time (T.T.) est un réactif pour le temps de thrombine (TT). Il mesure le temps de coagulation (TC) induit par une quantité contrôlée et constante de thrombine bovine, en présence de calcium, en plasma citraté. Le temps requis pour la formation d'un caillot stable est mesuré en secondes.

**REACTIFS :**

**R** Thrombine Bovine hautement purifiée, et Calcium, lyophilisée. Contient de la BSA et des stabilisants.

REF CK011K → 6 flacons de 2 mL.

REF CK011L → 6 flacons de 8 mL.

La concentration de thrombine bovine (environ 1.0 NIH/mL) peut varier de lot à lot et est ajustée pour chaque lot afin d'offrir un test de Temps de Thrombine très sensible aux faibles concentrations d'Héparine Non Fractionnée (HNF) et d'Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM).

**MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :**

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

**PRÉPARATION DES REACTIFS :**

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

**R** Reconstituer chaque flacon avec exactement :

REF CK011K → 2 mL d'eau distillée.

REF CK011L → 8 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

*Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 15 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.*

**STOCKAGE ET STABILITE :**

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

**R** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 7 jours à 2-8°C.
- 48 heures à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

**REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :****Réactifs:**

- Eau distillée.
- Contrôles spécifiques tels que :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
EASYPLASMA™ Control Set	225601

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

**Matériels:**

- Bain-Marie, automate de coagulation semi-automatique ou automatique.
- Chronomètre ; Pipettes calibrées ; tubes pour tests en plastique ou en verre silicé.

**PRELEVEMENTS ET PRÉPARATION DES ECHANTILLONS :**

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5<sup>2</sup> pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références<sup>2,3</sup>.

**PROCEDURE :**

Le coffret peut être utilisé en méthode manuelle ou automatisée. Le test est réalisé à 37°C, et le temps de coagulation, déclenché par l'ajout de la thrombine, est mesuré.

**Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.**

**Méthode de dosage :**

1. Reconstituer, si nécessaire, les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques.
2. Les plasmas doivent être testés **non dilués**.

3. Introduire dans une cuvette, un tube pour tests en plastique ou en verre siliciné incubé à 37°C :

Réactifs	Volume
Echantillons ou contrôles non dilués	100 µL
Incuber à 37°C pendant 1 minute, puis introduire (en déclenchant le chronomètre) :	
<b>R</b> Thrombine Bovine, préincubée à 37°C	100 µL
Enregistrer le temps de coagulation (TC, sec) exact.	

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

#### **CONTROLE QUALITE :**

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

#### **RESULTATS :**

- Le TC obtenu pour l'échantillon doit être comparé à celui de la zone normale de référence du laboratoire (se référer aux recommandations locales en vigueur).
- Les résultats peuvent être reportés en ratio :  
Ratio TT = Echantillon (TC, sec) / Moyenne des normaux (TC, sec).
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

#### **LIMITATIONS :**

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Différents médicaments ou traitements peuvent affecter les résultats du TT. Une investigation complémentaire devra être réalisée afin de déterminer l'origine de tout résultat anormal ou inattendu.
- Le TC obtenu pour un même échantillon et un même lot de réactifs est susceptible de varier en fonction de l'instrument utilisé et du mode de détection du caillot.  
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.
- Le test est sensible aux faibles concentrations d'héparine à condition que le plasma testé soit collecté sans activation ni libération de granules alpha de plaquettes, qui contiennent du PF4, un inhibiteur de l'héparine.<sup>1,2</sup>

#### **VALEURS ATTENDUES:**

Le temps de thrombine est généralement attendu < 25 secondes.

A titre d'exemple, pour un lot, la valeur moyenne chez des adultes sains (n=120) sur Sysmex CS-5100 était de 18,5 secondes avec un ET = 0,8 secondes. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres zones usuelles (zone normale, sensibilité à l'héparine...) pour chaque combinaison de lot, d'instrument et de protocole utilisé.

#### **PERFORMANCES:**

- Le réactif est sensible aux faibles concentrations d'héparine plasmatique (de 0,05 à 0,10 UI/mL d'HNF, et > 0,20 UI/mL d'HBPM dans le plasma).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 3 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	N	Moy.	CV%	SD	n	Moy.	CV%	SD
Contrôle 1	40	23,9	2,2	0,5	30	23,9	1,7	0,4
Contrôle 2	40	39,4	1,1	0,4	30	40,0	1,2	0,5

- Corrélation avec méthode (Test Thrombin Reagent (Siemens) sur Sysmex CS-5100 sur le T.T. en secondes) :  
n = 104    y = 1,64x - 11,64    r = 0,883

#### **Interférences:**

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes:

Intralipides	Hemoglobines	Bilirubine (F/C)
1000 mg/dL	1000 mg/dL	F : 30 / C : 60 mg/dL
Apixaban	Rivaroxaban	Edoxaban
400 ng/mL	400 ng/mL	400 ng/mL

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

#### **REFERENCES:**

- Appel I.M. *et al.* Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
- Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.

#### **SYMBOLES:**

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

#### **Changements par rapport à la précédente version.**