



# THROMBOPHEN HS (2,5) Ref CK550K

## Thromboplastin s kalcium pro stanovení prothrombinového času (PT)

Pouze pro diagnostické účely "In Vitro"

**HYPHEN BioMed**

ZAC Neuville Université – 155, rue d'Eragny  
95000 Neuville-sur-Oise – France  
Tél. : 01 34 40 65 10 – Fax : 01 34 48 72 36  
www.hyphen-biomed.com



Poslední revize: 05/03/2012

### POUŽITÍ:

Thrombophen HS (2,5) reagent je thromboplastinový reagent (obsahuje rekombinantní králičí tkáňový faktor a kalcium v optimalizované koncentraci) k měření prothrombinového času (PT) v lidské citrátové plazmě koagulační metodou. Lze použít manuální a automatizované provedení, pouze in vitro.

### 1. VZOREK

Citrátové plazma.

### 2. PRINCIP STANOVENÍ:

Měření prothrombinového času (PT), neboli Quickova času, stanovuje celkovou aktivitu koagulačních faktorů zevní koagulační cesty (koagulace spouštěná tromboplastinem uvolněným ze tkání). Tento test se užívá ke zkoumání vrozených nebo získaných krvácivých rizik (ty, které jsou spojeny se zevní aktivační cestou: Faktor II, V, VII, X), jaterních poruch, deficitu vitamínu K, fibrinolýzy, DIC. PT test je nejčastěji užíván k laboratornímu monitorování terapie antagonisty K vitamínu (VKA). Každé izolované prodloužení PT, které není spojeno s léčbou antagonisty vitamínu K (VKA) musí být dále zkoumáno testy na hladiny jednotlivých faktorů zevní koagulační aktivační cesty (FII, V, VII, X).

PT nezachytí deficit faktorů vnitřní koagulační cesty (FVIII, IX, XI, XII), poruchu funkce trombocytů, aktivitu FXIII a přirozených inhibitorů (antithrombin, Protein C, Protein S). Pro zkoumání vnitřní koagulační cesty (FVIII, IX, XI, XII) je doporučen aktivovaný parciální thromboplastinový čas (aPTT) a pro identifikaci dysfunkce trombocytů se doporučuje test krvácivosti.

Prothrombinový (Quickův) čas může být vyjádřen jako koncentrace nebo jako „International Normalized Ratio“ – INR (1).

### REAGENCE:

#### R1: Reagent 1: Thrombophen

PT reagent, obsahující rekombinantní králičí tkáňový faktor, syntetické fosfolipidy, kalciové ionty a heparin neutralizující substanci, vše lyofilizováno v přítomnosti stabilizátorů.

6 lahviček (každá musí být rozpuštěna s 2,5 ml destilované vody).

Hodnota ISI pro každou šarži je uvedena v letáku přiloženém k soupravě.

### Upozornění:

Žádný test nemůže úplně vyloučit přítomnost infekčních činitelů. Takže, jako s každým jiným produktem biologického původu, musí se s reagenty zacházet s předepsanou opatrností a jako s potenciálně infekčním materiálem.

### 3. REAGENCE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

#### Reagencie:

- Destilovaná voda, nejlépe sterilní
- Plazmy pro kontrolu kvality
- Imidazolový pufr (AR021A), pokud je požadována kalibrace

#### Materiál:

- Poloautomatický nebo automatický koagulační přístroj, nebo elektromagnetická vodní lázeň
- Stopky
- Kalibrované pipety

### 4. SKLADOVÁNÍ:

Reagencie musí být skladovány při teplotě 2-8°C, ve svém originálním balení. Potom jsou stabilní do data expirace, které je uvedeno na krabičce.

Pozn.: Studie stability po 3 týdny při teplotě 30°C ukázaly, že reagencie může být po krátkou dobu transportována za pokojové teploty bez poškození.

### 5. PŘÍPRAVA A STABILITA REAGENCIÍ:

Pozn.: rekonstituční objem může kolísat dle toho, jaký automat je použit. Přihlédněte vždy ke specifické adaptaci.

### R1: Reagent 1: Thrombophen:

Do každé lahvičky přidejte 2,5 ml destilované vody, mírně míchejte, dokud se obsah kompletně nerozpustí (Vortex). Nechte stabilizovat 15 minut za pokojové teploty (18-25°C) za občasného promíchání. Před každým použitím homogenizujte obsah.

Stabilita rozpuštěné reagencie, pokud bylo zabráněno kontaminaci nebo vypařování a pokud je v originální lahvičce:

- 4 týdnů při teplotě 2-8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C)
- Nemrazte

#### Upozornění:

Pro zlepšení stability vždy zavírejte reagencii po každém použití originální zátkou.

S reagentii musí být zacházeno s opatrností, aby nedošlo ke kontaminaci během užívání

Inkubace rekonstituované lahvičky za pokojové teploty umožní stabilizaci reagencie a získání homogenní reaktivy

Zabraňte vypařování reagencie během užívání (zejména v digestoři)

#### Pozn.:

Reagencie je uzavřena pod vakuem. Zátku odstraňujte opatrně, aby nedošlo ke ztrátě lyofilizátu.

Dle použité automatizované metody mohou být reagencie rekonstituovány jinými objemy, než je zde uvedeno. V každém případě musí být ale dodrženy reakční poměry (koncentrace reagentů v reaktivním prostředí).

### 6. PŘÍPRAVA PLAZMY (ODBĚR VZORKU):

Žádný test nemůže zcela vyloučit přítomnost patogenů. Vzorek plazmy musí být tedy považován za potenciálně infekční a musí s ním být zacházeno s opatrností.

Krev (9 objemů) musí být odebrána do 0.109 M (3,2%) citrátu sodného (1 objem) - poměr 1:10.

Plazma se oddělí centrifugací při 2500g po dobu 20 min.

Odběrové zkumavky s CTAD (obsahují citrát, theophyllin, adenosin, dipyridamol), užívané ke snížení destičkové aktivity, mohou být též použity. Plazma se oddělí centrifugací 15 minut při 1500 g.

Pozn.: použijte pouze zkumavky určené pro koagulační testy, aby nedošlo k aktivaci koagulace kontaktem na povrchu zkumavky. Po odběru promíchejte s antikoagulantem převrácením zkumavky (3 až 6x). Ujistěte se, že jsou vakuumové zkumavky naplněny po rysku. Vzorek musí být odebrán přímou venepunkcí a první kapky krve musí být odstraněny.

Pokud vzorek není testován ihned, přeneste plazmu plastovou pipetou do plastové zkumavky.

Citrátová plazma musí být testována do 24 hodin při skladování za pokojové teploty (18-25°C), nebo může být uchovávána při teplotě -20°C nebo nižší maximálně 2 týdny, nebo při -70°C až 6 měsíců.

Plazmu rozmrazujte těsně před použitím ve vodní lázni při 37°C. Rozmrazená plazma musí být opatrně promíchána a ihned po rozmrazení testována. Promíchání plazmy je klíčovým bodem, protože při mrazení mohou některé proteiny precipitovat.

Plazmu neskladujte při teplotě 2-8°C, aby nedošlo k aktivaci FVII, což by mohlo ovlivnit výsledek.

Nevyšetřujte lipemické a hemolytické vzorky.

Viz. Směrnice GEHT nebo NCCLS pro další instrukce týkající se odběru vzorků, manipulace a skladování.

### 7. PROVEDENÍ:

#### Mechanická manuální metoda:

Princip: pro detekci koagulace se užívají mechanické indikátory koagulace, např. kovová kulička, ukazatel. Test se provádí při teplotě 37°C.

Předehřejte dostatečný objem rekonstituovaného **Thrombophenu** na 37°C (pro 1 test je potřeba 0.2 ml). Vyvarujte se odpařování reagencie a nenechávejte reagencii při 37°C v neuzavřené lahvičce déle než 60 minut. Pokud byla reagencie při teplotě 37°C neuzavřena zátkou déle než 60 minut, zlikvidujte ji.

Do malé zkumavky, předehřáté na 37°C, nebo do reakční kvyety koagulačního přístroje pipetujte:

**100 µl** testované citrátové plazmy

inkubujte 1 – 2 minuty při 37°C (vlozte mechanický indikátor koagulace, pokud je nutný) a potom přidejte:

**200 µl** Thrombophenu předehřátého na 37°C a zapněte stopky.

Zaznamenejte čas koagulace v sekundách (zastavení kuličky nebo indikátoru, nebo jiná detekce vzniku koagula).

Distributor: Diagnostica a.s., Za Tráti 686, Praha 9, Česká republika, tel. 283 109 137, Fax. 283 109 132, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz)



D750-02/CK/550K

## Automatizované metody:

Adaptace na různé analyzátoři jsou k dispozici na vyžádání.

### Upozornění:

Pokud se použijí nižší nebo vyšší reakční objemy, než je uvedeno výše, musí být zachovány poměry mezi koncentrací reagentů ve směsi, respektive musí být zachovány poměry v objemech reagentů. Použití čisté skla nebo plastu je důležité. Povrch reakční nádoby může ovlivnit aktivaci vzorku. Použijte techniku stejnou, jaká je doporučována pro jiné koagulační testy. Uvedený návod k provedení jedнокrokového prothrombinového času je vhodný pro manuální metodu. Automatizované provedení by mělo být provedeno ve shodě se specifickými instrukcemi, které jsou dány výrobcem přístroje. Pozn.: pokud je užit THROMBOPHEN HS (2,5) na automatickém přístroji, „maximální čas“ měření by měl být vyšší než 50 sec. Pro kontrolní měření použijte vhodné kontrolní plazmy.

## 8. KONTROLA KVALITY:

Kontrola se provádí použitím komerčně dostupných plazem, které umožní validovat homogenitu výsledků v sérii měření i mezi seriami při použití stejné šarže reagentie. CLSI doporučuje změní kontrol před zahájením testování a nejméně jednou s každou skupinou testů. V laboratořích s vysokým počtem vzorků by měly být kontroly provedeny po každých 40-ti vzorcích.

Pokud jsou výsledky kontrol mimo referenční meze, nevydávejte výsledky vyšetřovaných vzorků. Zjistěte, která část testovacího systému (přístroj, reagentie, kontrola) je příčinou odchýlného výsledku. Po nápravě testujte znovu kontroly. Pokud jsou v mezích, je možné testovat vyšetřované vzorky a výsledky vydat. Každá laboratoř by měla stanovit svoje průměrné hodnoty a akceptabilní rozmezí kontrolních plazem za lokálních podmínek pro každou novou šarži kontrol.

Pozn.: nová verifikace musí být provedena vždy při změně šarže reagentie, po významné údržbě analyzátoru, nebo když jsou výsledky kontrol kvality mimo rozmezí pro metodu. Začleňte nejméně jednu kontrolu kvality (na různých hladinách) do každé série testů, nejméně jednou za 24 hodin. Koagulační časy mohou kolísat dle kombinace šarže reagentie/přístroj/použitý protokol. Každá laboratoř by měla stanovit vlastní akceptabilní rozmezí dle reagentie, přístroje a použitého protokolu.

## 9. VÝSLEDEK:

Získaný prothrombinový čas může být převeden na % normální aktivity, vyjádřen jako poměr nebo jako INR.

Pozn.: Vyjádření výsledku v INR je doporučováno pro pacienty léčené VKA a nemělo by být používáno pro předoperační vyšetření nebo u jaterních onemocněních.

Prothrombinový čas – Poměr:

$PT\ R = (PT\ \text{čas pacienta} / PT\ \text{čas normální kontroly nebo poolované normální plazmy})$

Normalizovaný poměr – INR:

$INR = (PT\ \text{čas pacienta} / PT\ \text{čas normální kontroly nebo poolované normální plazmy})^{ISI}$

ISI = International Sensitivity Index, je určen porovnáním tromboplastinu s WHO referenčním tromboplastinem.

Hodnota ISI je uvedena na přiloženém letáku a je specifická pro kombinaci reagentie/přístroj. Pro vlastní kombinaci metoda/přístroj je možné provést kalibraci ISI.

## 10. INTERPRETACE VÝSLEDKU:

Reagentie Thrombophen může být použita pro manuální i automatizované metody.

Výsledek ale může být různý dle použité metody detekce a není doporučeno porovnávat výsledky získané různými metodami detekce mezi sebou.

### Očekávané výsledky:

Koagulační časy mohou kolísat v závislosti na pracovních podmínkách, jako je teplota, kvalita vody, p. použitý systém, odběr vzorků, skladování vzorků a reagentie, vyšetřovaná populace. Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní normální rozmezí.

### Vyjádření výsledku:

Výsledek (v sekundách) je převeden na % aktivity odečtem z kalibrační křivky, nebo je vyjádřen v INR. Kalibrační křivka může být vytvořena ředěním referenční normální citrátové plazmy kalibrované a určené pro tento test (1.2).

(1) Kalibrační křivka (Thivolle line) se připraví ředěním referenční normální plazmy v Imidazolovém pufru ve shodě s následujícím schématem:

Procenta	100%	50%	25%	12,5%
ředění	bez ředění	1 : 2	1 : 4	1 : 8
objem plazmy	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
objem pufru	0.0 ml	0.5 ml	1.5 ml	3.5 ml

(2) Použití komerčních kalibrátorů – patřičný příbalový leták

Vykreslete křivku na lineární grafický papír. Na jednu osu vyneste stupeň ředění (1, 2, 4, 8) a na druhou odpovídající čas v sekundách. Z této křivky spočtete koncentraci prothrombinu testovaných vzorků (viz část Výsledek).

Odpovídající tabulky INR v závislosti na ISI konkrétní šarže použitého reagentu jsou uvedeny na letáku přiloženému ke každému balení.

Pro každou šarži THROMBOPHEN HS (2,5) a pro každou metodu nebo přístroj by měla být určena hodnota ISI za použití doporučené referenční metody a WHO tromboplastinu nebo odvozené metody (INR kalibrace). PT normální plazmy a plazmy pacientů léčených VKA je určeno jednak posuzovaným tromboplastinem a jednak referenčním tromboplastinem. Naměřené časy jsou vyneseny na bilogaritmický grafický papír a výpočtem ortogonální regrese je vytvořena linie. Slope této linie násobený hodnotou referenčního ISI je hodnota ISI posuzovaného tromboplastinu.

### Upozornění:

Hodnota ISI je specifická pro každou šarži a každou metodu nebo přístrojovou aplikaci.

Lokální ISI kalibrace by měla být prováděna za použití certifikovaných INR plazem.

Každá laboratoř musí definovat a validovat INR dynamické rozmezí pro reagent a použítou metodu a začlenit kontroly v nízké i vysoké oblasti tohoto rozmezí. PT/INR kalibrační rozmezí a použití INR certifikovaných plazem je též možné

## 11. CHARAKTERISTIKA

Opakovatelnost CV < 3%

Reprodukovatelnost CV < 3%

Žádné signifikantní interference s heparinem do 1 IU/ml a s FVII.

## 12. OČEKÁVANÉ HODNOTY

U normální populace: 70 – 100% (tyto hodnoty mohou kolísat o 11 – 15% dle typu tromboplastinu) Proloužení o 2 – 3 sekundy u novorozenců, 3 – 5 sekund u nedonošených. Hladin dospělých dosáhnou do 3 – 4 dnů po narození.

Koncentrace nad 100% nemají žádný patologický význam.

U nemocných léčených VKA je očekáváno terapeutické rozmezí 20 – 30%.

## 13. REFERENCE:

1. Quick and al J-J Am Asso (1938), 110, p.1658-1662
2. Hirsh J, Hull RD: *Venous Thromboembolism: Natural History, Diagnosis, and Management*, Boca Raton, FL, CRC Press Inc., 1987.
3. Brandt JT, Triplett DA: *Laboratory monitoring of heparin. Effect of reagents and instruments on the activated partial thromboplastin time*. Am J Clin Pathol 1981; 76:530.
4. Kumar R, Ansell JE, Canoso R, Deykin D: Clinical trial of a new bleeding time device. Am J Clin Pathol 1978; 70:642.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition*. CLSI document H21-A5 Vol. 28, No. 5, 2008.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline - Second Edition*. CLSI document H47-A2, Vol. 28 No. 20.
7. Poller L, Ibrahim S, Keown M., Pattison A., Jespersen J, *The prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR) Line: derivation of local INR with commercial thromboplastins and coagulometers – two independent studies*. J. Thromb Haemost 2011;9:140-8

Distributor: Diagnostica a.s., Za Tratí 686, Praha 9, Česká republika, tel. 283 109 137, Fax. 283 109 132, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz)



D750-02/CK/550K