

HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS

Art. Nr. CK002K

Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung von Hirudin und anderen direkten Thrombininhibitoren im Plasma

In-vitro-Diagnostikum

HYPHEN BioMed

ZAC Neuville Université - 155, rue d'Eragny
Tel. +33-1-34 40 65 10, Fax: +33-1-34 48 72 36
95000 Neuville-sur-Oise - France | www.hyphe-biomed.com

Vertrieb in Deutschland: CoaChrom Diagnostica GmbH
Tel. (kostenlos) 0800-24 66 33-0, Fax (kostenlos) 0800-24 66 33-3
Vertrieb in Österreich: CoaChrom Diagnostica GmbH
Tel. +43-1-699 97 97, Fax +43-1-699 18 97
Stolzenthalerg. 6, 1080 Wien | www.coachrom.com



Revision: 21/09/2009

VERWENDUNGSZWECK:

HEMOCLOT® Thrombin Inhibitors ist ein Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung von Hirudin und anderen direkten Thrombininhibitoren (DTIs, z.B. Argatroban®) im Plasma mit einer Gerinnungsmethode, die auf der Hemmung einer definierten, konstanten Thrombinkonzentration basiert.

PROBENMATERIAL:

Citratplasma, in dem die Aktivität von Hirudin (oder jedem anderen direkten Thrombininhibitor, z.B. Argatroban®) bestimmt werden soll.

TESTPRINZIP:

Zur Bestimmung von Hirudin oder anderer direkter Thrombininhibitoren im Plasma wird das verdünnte Probenplasma zunächst mit humanem, gepooltem Normalplasma versetzt. Die Gerinnung wird anschließend durch Zugabe einer konstanten Menge von hochgereinigtem, humanem α -Thrombin ausgelöst. Die gemessene Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels ist direkt proportional zur Hirudinkonzentration im Testplasma.

IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

Jede Testpackung enthält:

- R1: 3 Flaschen mit je 1 ml normalem Citratplasma, lyophilisiert (Reagenz 1).
- R2: 3 Flaschen mit je 1 ml hochgereinigtem, humanem Calcium-Thrombin (α -Form), durch Zusätze stabilisiert, lyophilisiert (Reagenz 2).

Warnhinweise: Thrombin (R2) wird durch Aktivierung von gereinigtem Prothrombin aus humanem Plasma gewonnen. Die zur Herstellung des gepoolten Normalplasmas (R1) verwendeten Plasmen wurden mit registrierten Methoden getestet und als negativ für Hepatitis B-Oberflächenantigen, Hepatitis C-Antikörper (HCV) und Antikörper gegen HIV 1 und 2 eingestuft. Bovines Serumalbumin (BSA) (R2) wurde aus bovinem Plasma hergestellt, das auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen wurde. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Jedes Produkt humanen Ursprungs, insbesondere Plasma, muss deshalb mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

Anmerkung:

Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern eingesetzt werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest., vorzugsweise steril.
- 0,15 M physiologische Kochsalzlösung oder Owren Koller Puffer (Art.Nr. AR003A/K). Für alle Tests muss die gleiche Verdünnungslösung verwendet werden.
- Normalplasma (oder Normales Poolplasma) und Referenzmaterial für Hirudin (oder für einen anderen zu bestimmenden DTI) oder Kalibrationsplasmen Set für die Hirudin Bestimmung (Lepirudin/Refludan®, Art.Nr. SC020K oder SC020L) bzw. für die Argatroban® Bestimmung (Art.Nr. SC030K).
- Qualitätskontrollplasmen für den zu bestimmenden DTI (z.B. Lepirudin, Art.Nr. SC025K oder Argatroban®, Art.Nr. SC035K).

Geräte:

- Automatische Pipetten mit Abgabevolumina von 20 μ l, 50 μ l und 100 μ l.
- Automatische Pipetten mit variablen Abgabevolumina von 50 bis 1000 μ l.
- Halb- bzw. vollautomatische Gerinnungsanalyser oder manuelles Koagulometer.

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2–8 °C in der Originalverpackung gelagert werden, sie sind dann bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

Anmerkung: Stabilitätsstudien bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- **R1:** Gepooltes Normalplasma: Das gepoolte Normalplasma mit 1 ml Aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut schütteln (Vortex). 15 Minuten bei Raumtemperatur (18–25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.
Stabilität des rekonstituierten Plasmas:
 - 8 Stunden bei Raumtemperatur (18–25°C).
 - 24 Stunden bei 2–8°C.
 - 2 Monate bei -20°C oder tiefer in der Originalflasche oder in einem Plastikröhrchen eingefroren (vor Gebrauch für mindestens 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad auftauen).

- **R2:** Humanes Calcium-Thrombin: jede Flasche mit 1 ml Aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut schütteln (Vortex). 15 Minuten bei Raumtemperatur (18–25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.
Stabilität des rekonstituierten Calcium-Thrombins:
 - 8 Stunden bei Raumtemperatur (18–25°C).
 - 24 Stunden bei 2–8°C.
 - 2 Monate bei -20°C oder tiefer in der Originalflasche oder in einem Plastikröhrchen eingefroren (vor Gebrauch für mindestens 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad auftauen).

Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination oder Verdunstung während der Verwendung zu vermeiden.
- Die Reagenzien werden unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust von Lyophilisat beim Öffnen zu vermeiden.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Testpackungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Testpackungen mit unterschiedlichen Chargennummern eingesetzt werden. Die Reagenzien sind in Bezug auf die Testcharge optimiert.

PROBENGEWINNUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109 M Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 2.500 g wird der Plasmaüberstand abgenommen. Das Citratplasma sollte bei Raumtemperatur (18–25°C) innerhalb von 8 Stunden, bei 2–8°C innerhalb von 24 Stunden getestet werden. Bei -20°C oder tiefer kann das Plasma für bis zu 6 Monate gelagert und kurz vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen bei Raumtemperatur (18–25°C) innerhalb von 4 Stunden getestet werden.

Anmerkung: Weitere Empfehlungen für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind dem GEHT oder NCCLS/CLSI Dokumenten zu entnehmen. Ikerische, hämolytierte, lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

PROBENVORVERDÜNNUNG:

Probenplasmen müssen 1:8 (d.h. 100 μ l Plasma und 700 μ l Verdünnungslösung) oder 1:20 (d.h. 100 μ l Plasma und 1900 μ l Verdünnungslösung) in 0,15 M physiologischer Kochsalzlösung oder Owren Koller Puffer entsprechend der vorgesehenen Testvariante vorverdünnt werden:

- 1:8 für den niedrigen Messbereich für Hirudin oder Argatroban® (0 bis 2 μ g/ml)
- 1:20 für den hohen Messbereich für Hirudin (0 bis 5 μ g/ml)

TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Test wird mit dem zu bestimmenden DTI kalibriert. Der Test ist derzeit für die Bestimmung von Hirudin (Lepirudin/Refludan® und Argatroban®) validiert. Folgende Messbereiche werden definiert:

Hirudin (übliche Dosierung): 0 bis 2 μ g/ml: niedriger Messbereich
Argatroban®: 0 bis 2 μ g/ml: niedriger Messbereich
Hirudin (hohe Konzentration): 0 bis 5 μ g/ml: hoher Messbereich

Der Test kann für Forschungszwecke auch zur Bestimmung anderer DTIs verwendet werden, kommerzielle Kalibratoren hierfür sind zum aktuellen Zeitpunkt aber noch nicht verfügbar. Zur Messung anderer direkter Thrombininhibitoren kann eine Kalibrationskurve mit Normalplasma, welches mit dem jeweiligen Inhibitor versetzt wurde, erstellt werden. Alternativ dazu kann die Hemmung unter Verwendung des Hirudin Kalibrators Art.Nr. SC020K/L auch als ‚Hirudin-Äquivalent‘ angegeben werden.

1. NIEDRIGER MESSBEREICH FÜR HIRUDIN ODER ARGATROBAN®

KALIBRATIONSKURVE:

Zur Erstellung der Kalibrationskurve für Hirudin oder Argatroban® werden die Plasmen aus dem jeweiligen Kalibrations-Kit (Art.Nr. SC020K für Hirudin bzw. SC030K für Argatroban®) nach Anleitung vorbereitet.

Zur Herstellung eigener Kalibratoren wird normales Citratplasma (bzw. normales Poolplasma) mit einer Konzentration von 2 μ g/ml Hirudin (vorzugsweise das zur Behandlung des Patienten eingesetzte Hirudin) oder Argatroban® versetzt.

Aus dieser Präparation bzw. dem Kalibrator-Kit erhält man die Kalibratorverdünnungen wie folgt:

μ g/ml zu bestimmender DTI: Hirudin oder Argatroban®	0	0,5 oder C:4	1 oder C:2	1,5 oder 3C:4	2 oder C
---	---	--------------------	------------------	---------------------	----------------

Die Kalibrationsplasmen müssen für den Test 1:8 mit physiologischer Kochsalzlösung oder Owren Koller Puffer verdünnt werden.

Um eine optimale Testleistung zu erzielen, ist die Kalibrationskurve unmittelbar vor der Testung zu erstellen.

Plasmaproben oder Kontrollen

Die Plasmaproben und Kontrollen werden 1:8 (d.h. 100 µl Plasma und 700 µl Verdünnungslösung) in Owren Koller Puffer oder physiologischer Kochsalzlösung (0,15 M NaCl) vorverdünnt. Die verdünnten Proben müssen innerhalb einer Stunde getestet werden.

Testansatz

Thrombin (Reagenz 2) bei 37°C vorinkubieren.

In ein auf 37°C vorgewärmtes Teströhrchen oder eine Küvette wird zugegeben:

- 100 µl gepooltes Normalplasma (Reagenz 1).
- 50 µl Kalibratorverdünnung oder Probenplasma, 1:8 vorverdünnt.

1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben:

- 100 µl Thrombin (Reagenz 2, bei 37°C vorinkubiert). Start der Stoppuhr.

Aufzeichnung der Gerinnungszeit in Sekunden.

Anmerkung: Der Test kann auch zur Bestimmung anderer DTIs verwendet werden (derzeit als In-Vitro-Forschungsreagenz). Der Anwender muss hierfür eine eigene Kalibrationskurve, abgestimmt auf den erwarteten therapeutischen Bereich und den Messbereich für den verwendeten DTI, erstellen. Auch die Probenverdünnung muss angepasst werden (siehe Literatur Poster PP-TH-134 ISTH 2009).

2. HOHER MESSBEREICH FÜR HIRUDIN

Diese Vorschrift ist für die Bestimmung von Hirudin in Citratplasma im Konzentrationsbereich von ca. 2 bis 4 µg/ml vorgesehen (z.B. ECC).

Kalibrationskurve

Zur Erstellung der Kalibrationskurve kann der Kalibrator-Kit Plasma Hirudin Standard High (Art.Nr. SC020L) verwendet werden. Die Plasmen müssen genau nach Anleitung vorbereitet werden.

Zur Herstellung eigener Kalibratoren wird normales Citratplasma (bzw. normales Poolplasma) mit einer Konzentration von 5 µg/ml Hirudin hergestellt, wobei das zur Behandlung des Patienten verwendete Hirudin bevorzugt eingesetzt werden sollte.

Aus dieser Präparation bzw. dem Kalibrator-Kit erhält man die Kalibratorverdünnungen wie folgt:

µg/ml Hirudin	0	1,25 oder C:4	2,5 oder C:20	3,75 oder 3C:4	5 oder C
---------------	---	---------------------	---------------------	----------------------	----------------

Die Kalibrationsplasmen müssen für den Test 1:20 mit physiologischer Kochsalzlösung oder Owren Koller Puffer verdünnt werden.

Um eine optimale Testleistung zu erzielen, ist die Kalibrationskurve unmittelbar vor der Testung zu erstellen.

Plasmaproben oder Kontrollen

Die Plasmaproben oder Kontrollen werden 1:20 (d.h. 100 µl Plasma und 1900 µl Verdünnungslösung) in Owren Koller Puffer oder physiologischer Kochsalzlösung (0,15 M NaCl) vorverdünnt. Die verdünnten Proben müssen innerhalb einer Stunde getestet werden.

Testansatz

Thrombin (Reagenz 2) bei 37°C vorinkubieren.

In ein auf 37°C vorgewärmtes Teströhrchen oder eine Küvette wird zugegeben:

- 100 µl gepooltes Normalplasma (Reagenz 1).
- 50 µl Kalibratorverdünnung oder Probenplasma, 1:20 vorverdünnt.

1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben:

- 100 µl Thrombin (Reagenz 2, bei 37°C vorinkubiert). Start der Stoppuhr

Aufzeichnung der Gerinnungszeit in Sekunden.

Automatisierte Methoden:

Anleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Spezielle Adaptionen und Vorsichtsmaßnahmen für das verwendete Gerät sind zu beachten.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität von Analyse zu Analyse bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen. Die Kalibrationskurve ist gültig, wenn die Linearität (r²≥0,98) und die Konzentrationen der gemessenen Kontrollen innerhalb des Vertrauensbereichs liegen. Es sind verschiedene Qualitätskontrollen erhältlich: Plasma Hirudin Control, Art.Nr. SC025K (C1 repräsentiert den niedrigen Messbereich, C2 den hohen Messbereich) oder Argatroban® Control Plasma, Art.Nr. SC035K.

Jedes Labor kann seine eigenen Zielwerte und Vertrauensbereiche, unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen, für jede neue Reagenzcharge festlegen.

Anmerkung:

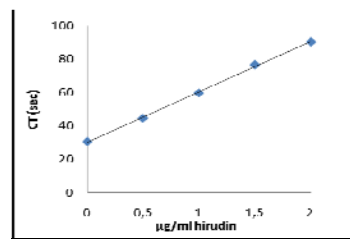
- In jeder Analysenserie sollte zumindest eine Kontrolle gemessen werden (GLP).
- Für jede Testserie sollte eine neue Kalibrationskurve erstellt werden, zumindest aber für jede neue Reagenzcharge, ebenso nach Wartungsarbeiten am Analysengerät oder wenn die gemessenen Werte der Kontrollen nicht im Vertrauensbereich für die jeweilige Methode liegen.
- Jedes Labor sollte seine eigenen Zielwerte und Vertrauensbereiche in Abhängigkeit des verwendeten Reagenz, der Chargen, Geräte und Protokolle, die verwendet werden, definieren und validieren.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE:

Auf Millimeterpapier wird die Konzentration (µg/ml) des gemessenen DTIs auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Gerinnungszeit auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Die Inhibitorkonzentrationen in den Probenplasmen können direkt aus der erhaltenen Kalibrationskurve interpoliert werden. Bei Verwendung von Gerinnungsautomaten wird die DTI Konzentration automatisch in Bezug auf die Kalibrationskurve unter Berücksichtigung der Probenverdünnung ermittelt. Die gemessene Konzentration an DTI muss unter Beachtung der Dosierung und dem klinischen Kontext des Patienten beurteilt werden. Im Falle eines unerwarteten Ergebnisses muss der Test erneut durchgeführt werden oder die Hypokoagulabilität des Patienten mit einer anderen Testmethode evaluiert werden.

BEISPIELKALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve, erstellt mit der manuellen Methode für Hirudin im niedrigen Messbereich, dient lediglich als Beispiel. Die bei der Bestimmung von Argatroban® erhaltenen Gerinnungszeiten sind etwas kürzer. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



TESTCHARAKTERISTIK:

Die Reagenzien im Testkit HEMOCLOT® Thrombin Inhibitors enthalten keine Heparinblocker. Die Anwesenheit von Heparin oder weiterer, nicht der zu bestimmenden Substanz entsprechender Thrombinhemmstoffe, kann den Test beeinflussen und die Gerinnungszeiten verlängern. Bei der Messung wird jeder im Probenplasma vorhandene Thrombinhemmstoff erfasst, wodurch die Unterschätzung einer vorhandenen Hypokoagulabilität vermieden wird.

- Normalplasmen (ohne Behandlung) enthalten keine Thrombininhibitoren (≤ 0,10µg/ml im niedrigen Messbereich).
- Die folgenden Werte für die Reproduzierbarkeit (ermittelt am STA-R mit lyophilisierten Kalibratoren) dienen lediglich als Beispiel:

Lyophilisierte Probe	µg/ml	Intra-assay VK [%]	Inter-assay VK [%]
Hirudin (niedriger Messbereich)	1,15	2,8% (N=10)	5,0% (N=6)
Argatroban® (niedriger Messbereich)	1,25	2,3% (N=10)	2,2% (N=5)

Testeinschränkungen:

- Eine Aktivierung der Probe während der Blutentnahme oder Plasmagewinnung kann den Test beeinflussen.
- Iktische, hämolysierte, lipämische Plasmen sind zu verwerfen.
- Gemäß dem Testprinzip, mit Verwendung von verdünnten Plasmaproben und Substratplasma im Überschuss, wurde keine signifikante Beeinflussung durch Überschuss oder Mangel an anderen Plasmafaktoren festgestellt. Besondere Vorsicht wird bei Patienten, die eine angeborene oder erworbene Hypokoagulabilität aufweisen empfohlen.
- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.
- Jedes Labor muss seine eigenen Messbereiche, erwartete Werte und Vertrauensbereiche sowie Testleistung unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen (Kombination aus verwendeten Reagenzien und Geräten) für die spezifischen Anwendungen selbst definieren und validieren.

ERGÄNZENDE INFORMATIONEN:

Der Test ist für die Bestimmung von Hirudin, angegeben in µg/ml, optimiert. Die spezifische Aktivität von Hirudinpräparaten kann sich von Produkt zu Produkt bzw. Charge zu Charge unterscheiden (von <10.000 ATE*/mg bis zu >15.000 ATE*/mg). Die Kalibrationskurven werden in Bezug auf die Hirudinkonzentration erstellt. Falls eine Kalibration in Bezug auf die Hirudinaktivität, ausgedrückt in ATE*/ml, erforderlich ist oder wenn ein anderer Thrombininhibitor bestimmt werden soll, muss der Anwender die spezifische Anti-Thrombin-Aktivität der verwendeten Präparation berücksichtigen.

*ATE: Anti-Thrombin-Einheit

LITERATUR:

1. Greinacher A., Warkentin T., „The direct thrombin inhibitor hirudin“, Thromb Haemost 2008; 99:819-829.
2. "Landmarks in Anti-Thrombin Drug Development: The Argatroban Story", Seminars in Thrombosis and Haemostasis, Vol 34, Suppl 1, Oct 2008
3. J Stangier et al, "Measurement of the Pharmacodynamic Effect of Dabigatran Etxelilate: Thrombin Clotting Time", Poster PP-TH-134, ISTH 2009