

HEMOCLOT® THROMBIN INHIBITORS

Ref. Nr. CK002L



Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung von direkten Thrombin Inhibitoren (DTI) im Plasma

In-vitro-Diagnostikum



www.hyphen-biomed.com
155, rue d'Eragny, F 95000 Neuville-sur-Oise
Tél. +33-1-3440 6510 | Fax +33-1-3448 7236
Vertrieb: www.coachrom.com
CoaChrom Diagnostica GmbH
Stolzenthalgasse 6, A 1080 Wien
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3
Tel. +43-1-699 97 97 | Fax +43-1-699 18 97

Revision: 17/12/2010cc

VERWENDUNGSZWECK:

HEMOCLOT® THROMBIN INHIBITORS ist ein Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung von direkten Thrombin Inhibitoren (DTI) wie Hirudin, Argatroban und Dabigatran im Citratplasma. Die Methode basiert auf der Hemmung einer definierten, konstanten Menge an Thrombin durch direkte Thrombin Inhibitoren. Die Messung von DTI Plasmaspiegeln ist insbesondere bei Verdacht auf zu hohe antikoagulatorische Aktivität hilfreich.

PROBENMATERIAL:

Citratplasma, in dem die Aktivität direkter Thrombin Inhibitoren bestimmt werden soll.

TESTPRINZIP:

Zur Bestimmung von Hirudin oder anderer direkter Thrombin Inhibitoren im Plasma wird das verdünnte Probenplasma zunächst mit humanem, gepooltem Normalplasma (R1) versetzt. Die Gerinnung wird anschließend durch Zugabe einer konstanten Menge von hochgereinigtem, humanem α -Thrombin (R2) ausgelöst. Die gemessene Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels ist direkt proportional zur DTI Konzentration im Testplasma.

IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

Jede Testpackung enthält:

- Reagenz 1 (R1): 3 Flaschen mit je 2,5 ml normalem Citratplasma, lyophilisiert.
- Reagenz 2 (R2): 3 Flaschen mit je 2,5 ml hochgereinigtem, humanem Calcium-Thrombin (α -Form), durch Zusätze stabilisiert und lyophilisiert.

ACHTUNG: Thrombin (R2) wird durch Aktivierung von gereinigtem Prothrombin aus humanem Plasma gewonnen. Die zur Herstellung der Reagenzien verwendeten Plasmen wurden mit registrierten Methoden getestet und als negativ für HIV Antikörper, HBs AG und HCV 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.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest., vorzugsweise steril
- 0,15 M physiologische Kochsalzlösung (NaCl), Imidazolpuffer (Ref.Nr. AR021) oder Owren-Koller-Puffer zur Verdünnung der Proben (für alle Proben muss die gleiche Verdünnungslösung verwendet werden).
- Normalplasma und Referenzmaterial für Hirudin bzw. andere zu bestimmenden DTI oder titrierte Kalibrations- und Kontrollplasmen. Folgende Referenzmaterialien sind von Hyphen BioMed verfügbar:

	Hirudin (Lepirudin/Refludan®)	Argatroban	Dabigatran
Kalibratoren	SC020K (Niedriger (gewöhnlicher) Bereich) SC020L (Hoher Bereich) (2 Kalibratoren für die Herstellung von 5 Konzentrationen)	SC030K (5 gebrauchsfertige Konzentrationen)	222801 (3 gebrauchsfertige Konzentrationen)
Kontrollen	SC025K	SC035K	224701

Geräte:

- Pipetten mit Abgabevolumina von 20 μ l, 50 μ l und 100 μ l
- 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 und sind bis zum, auf dem Etikett aufgedruckten, Verfalldatum stabil.

Anmerkung: Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- **R1** Gepooltes Normalplasma: die Flasche mit 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen (Vortex). 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den rekonstituierten Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.
- **R2** Humanes Calcium-Thrombin: die Flasche mit 2,5 ml Aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen (Vortex). 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den rekonstituierten Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Stabilität der rekonstituierten Reagenzien:

- 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, 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, jegliche Kontamination oder Verdunstung während der Verwendung ist zu vermeiden.
- Die Reagenzien werden unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust von Lyophilisat beim Öffnen zu vermeiden.
- Die Inkubation der rekonstituierten Reagenzien bei RT stabilisiert diese und führt zu einer homogenen Reaktivität.
- Die Verdunstung während des Reagenzgebrauchs z.B. durch Verwendung von „Reducern“ (zur Verringerung der Verdunstungsfläche) so gering wie möglich halten.
- Es dürfen ausschließlich Reagenzien aus Packungen mit übereinstimmender Chargennummer verwendet werden. Die Reagenzien sind in Bezug auf die Testcharge optimiert.
- Die - bei Hyphen BioMed verfügbaren - gerätespezifischen (Gerinnungsanalyser) Angaben zum Testablauf sind zu beachten.

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109M Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 2500 g wird der Plasmaüberstand abgenommen.

Das Citratplasma sollte innerhalb folgender Zeitspannen gemessen werden:

- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
- 24 Stunden bei 2-8°C
- 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 den GEHT und NCCLS/CLSI Dokumenten zu entnehmen. Ikerische, hämolytierte, lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

Probenplasma Vorbereitung:

Probenplasmen müssen in 0,15 M NaCl, Imidazolpuffer oder Owren-Koller-Puffer, entsprechend der vorgesehenen Testvariante vorverdünnt werden:

Niedriger (gewöhnlicher) Messbereich: 1:8 Verdünnung
Hoher (Hirudin) Messbereich: 1:20 Verdünnung

TESTDURCHFÜHRUNG:

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

Niedriger (gewöhnlicher) Messbereich:

Hirudin (übliche Dosierung): 0 bis 2,0 μ g/ml
Dabigatran: 0,05 bis 0,5 μ g/ml
Argatroban: 0 bis 2,0 μ g/ml

Hoher (Hirudin) Messbereich:

Hirudin (hohe Dosierung): 0 bis 5,0 μ g/ml

Der Test kann für Forschungszwecke auch zur Bestimmung anderer direkter Thrombin Inhibitoren verwendet werden. Für diesen Zweck muss eine Kalibrationskurve mit Normalplasma, welches mit dem jeweiligen Inhibitor versetzt wurde, erstellt werden. Alternativ dazu kann die Inhibition unter Verwendung des Hirudin Kalibrators Ref.Nr. SC020K/L auch als „Hirudin-Äquivalent“ angegeben werden.

1. NIEDRIGER (GEWÖHNLICHER) MESSBEREICH

Kalibrationskurve:

Zur Erstellung der Kalibrationskurven für Hirudin, Argatroban oder Dabigatran werden die Plasmen aus der jeweiligen Kalibrator-Packung (Ref.Nr. SC020K für Hirudin, SC030K für Argatroban, 222801 für Dabigatran) gemäß deren chargenspezifischer Packungsbeilage mit exakter Angabe der jeweiligen DTI Konzentration „C“ vorbereitet.

Alternativ kann mit normalem Citratplasma (Poolplasma) und Hirudin - vorzugsweise das zur Behandlung des Patienten eingesetzte Präparat - ein eigener Kalibrator in einer Konzentration von 2,0 μ g/ml hergestellt werden. Sinngemäß gilt dies auch für Argatroban oder Dabigatran.

Falls keine gebrauchsfertigen Kalibratoren verwendet werden, kann die Kalibrationskurve durch Verdünnung von Kalibrationsplasma mit Normalplasma wie folgt hergestellt werden:

µg/ml Hirudin oder Argatroban	0	0,5 oder C:4	1,0 oder C:2	1,5 oder 3C:4	2,0 oder C
-------------------------------	---	-----------------	-----------------	------------------	---------------

µg/ml Dabigatran	0,05 oder C:10	0,25 oder C:2	0,50 oder C
------------------	-------------------	------------------	----------------

Diese Kalibrationsplasmen werden 1:8 (z.B. 100 µl Plasma und 700 µl Puffer) mit 0,15 M NaCl, Imidazolpuffer oder Owren-Koller-Puffer verdünnt. Bei Verwendung des Testkits auf Gerinnungsanalyzern, ist die gerätespezifische Adaptionanleitung (erhältlich von Hyphen BioMed) zu beachten.

Um eine optimale Testleistung zu erzielen, ist die Kalibrationskurve unmittelbar vor dem Testlauf herzustellen.

Plasmaproben oder Kontrollen

Die Plasmaproben und Kontrollplasmen werden 1:8 (z.B. 100 µl Plasma und 700 µl Puffer) mit 0,15 M NaCl, Imidazolpuffer oder Owren-Koller-Puffer vorverdünnt. Die verdünnten Proben müssen innerhalb einer Stunde getestet werden.

2. HOHER MESSBEREICH FÜR HIRUDIN

Diese Vorschrift ist für die Bestimmung von Hirudin im zu erwartenden Plasma-Konzentrationsbereich von ca. 2 bis 4 µg/ml vorgesehen (z.B. extrakorporale Zirkulation).

Kalibrationskurve

Zur Erstellung der Kalibrationskurve wird das Kalibrationsplasma (Ref.Nr. SC020L) gemäß chargenspezifischer Packungsbeilage auf die Konzentration „C“ rekonstituiert.

Alternativ kann mit normalem Citratplasma (Poolplasma) und Hirudin - vorzugsweise das zur Behandlung des Patienten eingesetzte Präparat - ein eigener Kalibrator in einer Konzentration von 5,0 µg/ml hergestellt werden.

Für die Kalibrationskurve werden in Normalplasma folgende Verdünnungen hergestellt:

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

Diese Kalibrationsplasmen werden 1:20 (z.B. 100 µl Plasma und 1900 µl Puffer) mit 0,15 M NaCl, Imidazolpuffer oder Owren-Koller-Puffer verdünnt. Bei Verwendung des Testkits auf Gerinnungsanalyzern ist die gerätespezifische Adaptionanleitung (erhältlich von Hyphen BioMed) zu beachten.

Um eine optimale Testleistung zu erzielen, ist die Kalibrationskurve unmittelbar vor dem Testlauf herzustellen.

Plasmaproben oder Kontrollen

Die Plasmaproben und Kontrollplasmen werden 1:20 (z.B. 100 µl Plasma und 1900 µl Puffer) mit 0,15 M NaCl, Imidazolpuffer oder Owren-Koller-Puffer vorverdünnt. Die verdünnten Proben müssen innerhalb einer Stunde getestet werden.

3. TESTPROTOKOLL

Anmerkung: Es werden generell Doppelbestimmungen empfohlen.

Manuelle Methode:

<i>Thrombin (Reagenz 2) bei 37°C vorinkubieren</i>
<i>In ein auf 37°C vorgewärmtes Teströhrchen oder eine Küvette wird zugegeben:</i>
100 µl gepooltes Normalplasma (Reagenz 1)
50 µl Probenplasma, Kalibrationsplasma oder Kontrollplasma - jeweils 1:8 (niedriger Bereich) oder 1:20 (hoher Bereich) vorverdünnt
<i>1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben:</i>
100 µl Thrombin (Reagenz 2, bei 37°C vorinkubiert)
<i>Start der Stoppuhr. Aufzeichnung der Gerinnungszeit in Sekunden.</i>

Anmerkung: Der Test kann für Forschungszwecke auch zur Bestimmung anderer direkter Thrombin Inhibitoren verwendet werden. Dafür muss eine Kalibration im zu erwartenden therapeutischen Bereich des DTI erstellt und die Vorverdünnung an den dynamischen Messbereich angepasst werden.

Automatisierte Methoden:

Anleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die Substanz (DTI) sowie die gerätespezifische Adaptionanleitung ist zu beachten.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht, bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen, die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität von Analyse. Die Kalibrationskurve ist gültig, wenn die Linearität ($r^2 \geq 0,98$) und die Konzentrationen der gemessenen Kontrollen innerhalb des Vertrauensbereichs liegen. Es sind Qualitätskontrollplasmen für Hirudin/Lepirudin, Argatroban und Dabigatran verfügbar. Jedes Labor sollte unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen für jede neue Reagenzcharge die Zielwerte und Vertrauensbereiche verifizieren und falls notwendig anpassen.

Anmerkung:

- In jeder Analysenserie sollte zumindest eine, dem Messbereich entsprechende, Kontrolle gemessen werden (GLP).
- Für jede Testserie kann eine neue Kalibrationskurve erstellt werden, jedenfalls ist diese für neue Reagenzchargen, nach Wartungsarbeiten am Analysengerät oder wenn die gemessenen Werte der Kontrollen nicht im Vertrauensbereich für die jeweilige Methode liegen (nach Kontrolle aller Parameter des Messsystems) zu erstellen.
- Jedes Labor kann seine eigenen Zielwerte und Vertrauensbereiche in Abhängigkeit der verwendeten Reagenzien, Chargen, Geräte und Protokolle definieren und validieren.

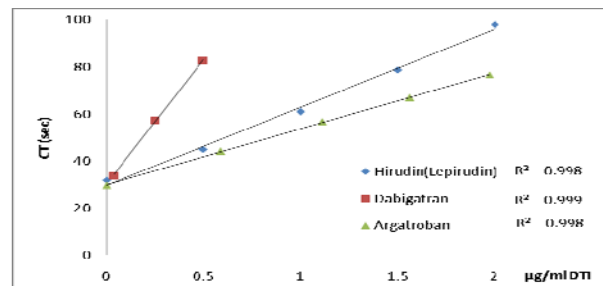
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE:

Auf Millimeterpapier wird die Konzentration (µg/ml) des gemessenen DTI auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Gerinnungszeit auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Die Inhibitorkonzentration in den Probenplasmen kann direkt von der erhaltenen Kalibrationskurve abgelesen werden.

Bei Verwendung von Gerinnungsautomaten wird die DTI Konzentration automatisch im 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 wiederholt und falls nötig die Hypokoagulabilität des Patienten mit einer anderen Testmethode evaluiert werden.

BEISPIEL FÜR EINE KALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve, erstellt mit STA-R im niedrigen Messbereich, dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



TESTCHARAKTERISTIK:

HEMOCLLOT® THROMBIN INHIBITORS enthält 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 somit jeder im Probenplasma vorhandene Thrombinhemmstoff erfasst, wodurch die Unterschätzung einer vorhandenen Hypokoagulabilität vermieden werden soll.

Normalplasmen (ohne Therapie) enthalten keine Thrombin Inhibitoren ($\leq 0,05$ bis $0,10 \mu\text{g/ml}$ im niedrigen Messbereich).

Die folgenden Werte für die Reproduzierbarkeit (ermittelt am STA-R mit lyophilisierten Kalibratoren im niedrigen Messbereich) dienen lediglich als Beispiel:

Lyophilisierte Probe	µg/ml	Intra-Assay VK %	Inter-Assay VK %
Hirudin	1,15	2,8% (N=10)	5,0% (N=6)
Dabigatran	0,12	2,2% (N=20)	5,3% (N=9)
Argatroban	1,25	2,3% (N=10)	2,2% (N=5)

Testeinschränkungen:

Eine Aktivierung der Probe während der Blutentnahme oder Plasmagewinnung kann den Test beeinflussen. Ikterische, hämolytierte, lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

Gemäß dem Testprinzip (Verwendung von verdünnten Plasmaproben und Substratplasma (R1) im Überschuss) wurde keine signifikante Beeinflussung durch Überschuss oder Mangel an anderen Plasmafaktoren festgestellt. Besondere Vorsicht wird bei Plasmen mit konstitutioneller oder erworbener Hypokoagulabilität empfohlen. Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

Jedes Labor sollte seine eigenen Messbereiche, erwartete Werte und Vertrauensbereiche unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen (Kombination aus verwendeten Reagenzien und Geräten) selbst definieren und validieren.

ERGÄNZENDE INFORMATIONEN:

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

*ATE: Anti-Thrombin-Einheit

LITERATUR:

- Greinacher A., Warkentin T., „The direct thrombin inhibitor hirudin“, Thromb Haemost 2008; 99:819-829.
- „Landmarks in Anti-Thrombin Drug Development: The Argatroban Story“, Seminars in Thrombosis and Haemostasis, Vol 34, Suppl 1, Oct 2008
- J Stangier et al, „Measurement of the Pharmacodynamic Effect of Dabigatran Etexilate: Thrombin Clotting Time“, Poster PP-TH-134, ISTH 2009
- Van Ryn et al, „Dabigatran etexilate – a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity“, Thromb Haemost 2010; 103: 1116-1127.