

# HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS

Art.Nr. CK002K

Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung von Dabigatran und anderen direkten Thrombin-Inhibitoren (DTI) im Plasma



In-vitro-Diagnostikum



Vertrieb und Support:

CoaChrom Diagnostica GmbH

www.coachrom.com | info@coachrom.com

Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111

Kostenfreie Nummern für Deutschland:

Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

## VERWENDUNGSZWECK:

HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS ist ein Gerinnungstest zur quantitativen Bestimmung von Dabigatran und anderen direkten Thrombin-Inhibitoren (DTI) wie Hirudin, Argatroban und Dabigatran bei Verdacht auf zu hohe antikoagulatorische Aktivität im Plasma. Die Methode basiert auf der Hemmung einer definierten, konstanten Menge an Thrombin.

## TESTPRINZIP:

Zur Bestimmung von Dabigatran 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  $\alpha$ -Thrombin (R2) ausgelöst. Die gemessene Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels ist direkt proportional zur DTI-Konzentration im Testplasma.

## IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

Jede Packung enthält:

- Reagenz 1 (R1): 3 Flaschen mit je 1 ml normalem gepooltem Citratplasma, lyophilisiert.
- Reagenz 2 (R2): 3 Flaschen mit je 1 ml hochgereinigtem, humanem Calcium-Thrombin ( $\alpha$ -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) 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) oder Imidazol Puffer, Art.Nr. AR021, zur Verdünnung der Proben (für alle Proben muss die gleiche Verdünnungslösung verwendet werden).
- Normalplasma und Referenzmaterial für Dabigatran bzw. andere zu bestimmende DTI oder titrierte Kalibrations- und Kontrollplasmen. Folgende Referenzmaterialien sind von Hyphen BioMed verfügbar:

	Argatroban	Dabigatran (Üblicher Bereich bis 500 ng/ml)	Dabigatran (niedriger Bereich bis 100 ng/ml)	Hirudin
Kalibratoren (Art.Nr.)	SC030K 5 gebrauchsfertige Konzentrationen	222801 3 gebrauchsfertige Konzentrationen	222901 3 gebrauchsfertige Konzentrationen	SC020K Niedriger (üblicher) Bereich oder SC020L Hoher Bereich (Jeweils 2 Kalibratoren für die Herstellung von 5 Konzentrationen)
Kontrollen (Art.Nr.)	SC035K	224701	225001	SC025K

Geräte:

- Pipetten mit Abgabevolumina von 20  $\mu$ l, 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l
- Pipetten mit variablen Abgabevolumina von 50 bis 1000  $\mu$ 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 über 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 genau 1,0 ml aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den rekonstituierten Inhalt vor jedem Gebrauch durchmischen.
- **R2:** Humanes Calcium-Thrombin: die Flasche mit genau 1,0 ml aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen.

Mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Den rekonstituierten Inhalt vor jedem Gebrauch durchmischen.

## 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.  
Vor Gebrauch für mindestens 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad auftauen.

## Vorsichtsmaßnahmen:

- Die Gefrierkonditionen und Stabilität der aufgetauten Reagenzien müssen unter den jeweiligen Laborbedingungen geprüft werden.
- 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 gerätespezifischen (Gerinnungsanalyser) Angaben zum Testablauf sind zu beachten.

## PROBENGEWINNUNG:

Gewinnung und Lagerung der Proben geschehen gemäß den Vorgaben von GEHT und NCCLS/CLSI.

- **Probenmaterial:** Citratplasma, in dem die Aktivität direkter Thrombin-Inhibitoren bestimmt werden soll.
- **Gewinnung:** Blut (9 Volumenteile) wird in Trinatrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) durch Venenpunktur abgenommen. Das erste Röhrchen muss aussortiert werden. Der Zeitraum zwischen Probengewinnung und Tests sollte zwischen einer und zwei Stunden liegen und vier Stunden nicht überschreiten.
- **Zentrifugation:** Die Zentrifugation ist ein wichtiger Schritt und dient der Separation des Plasmas von den Plättchen. Um ein plättchenarmes Plasma zu erhalten, ist eine validierte Labormethode zu nutzen wie eine Zentrifugation für mindestens 15 Minuten bei 2000 g bei Raumtemperatur (18 bis 25°C).
- **Lagerung des Plasmas:**
  - 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
  - Bei -20°C oder tiefer kann das Plasma für bis zu 2 Monate gelagert und kurz vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden.

## TESTDURCHFÜHRUNG:

Der Test wird mit dem zu bestimmenden DTI kalibriert und ist derzeit für die Bestimmung von Dabigatran, Argatroban und Hirudin validiert. Folgende Messbereiche wurden definiert:

	Dabigatran (Niedrig)	Dabigatran	Argatroban	Hirudin (Niedrig)	Hirudin
Messbereich	0 bis 120 ng/ml	50 bis 500 ng/ml	0 bis 2 $\mu$ g/ml	0 bis 2 $\mu$ g/ml	2 bis 4 $\mu$ g/ml

Der Test kann auch zur Bestimmung anderer direkter Thrombin-Inhibitoren verwendet werden, jedoch nur zu Forschungszwecken. Das Analyseprotokoll muss dem zu bestimmenden DTI angepasst werden: Die Kalibratoren können erstellt werden, indem der zu quantifizierende Inhibitor in Normalplasma gelöst wird.

## Test für Dabigatran und Argatroban (manuelle Methode):

1. Die Kalibrationskurve muss mit dem für den jeweiligen zu bestimmenden DTI spezifischen Kalibrator-Kit erstellt werden. Kalibrationsplasma sollte verdünnt werden wie in der unten stehenden Tabelle beschrieben. Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen innerhalb einer Stunde zu überprüfen, um eine optimale Testleistung zu erzielen.
2. Die Proben, Kontrollen und Kalibratoren sollten verdünnt werden wie in der nachfolgenden Tabelle beschrieben:

Test	Kalibrator (Art.Nr.)	Kontrolle (Art.Nr.)	Verdünnung
Dabigatran	222801	224701	1/8
Dabigatran (Niedriger Bereich)	222901	225001	1/2
Argatroban	SC030K	SC035K	1/8

Die Verdünnungen müssen innerhalb von einer Stunde getestet werden. Bitte beachten: Die exakte Konzentration der Kalibratoren und Kontrollen für das jeweilige Lot sind dem mitgelieferten Beipackzettel zu entnehmen.

3. Für die manuelle Methode wird in ein auf 37°C vorgewärmtes Teströhrchen zugegeben:

Reagenz	Menge
R1: Gepooltes Normalplasma	100 µl
Probenplasma, Kalibrationsplasma oder Kontrollplasma	50 µl
1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben und die Zeitmessung starten:	
R2: Bei 37°C vorinkubiertes Thrombin	100 µl
Aufzeichnung der Gerinnungszeit in Sekunden	

#### Test für Hirudin (manuelle Methode):

1. Die Kalibrationskurve ist gemäß den spezifischen Instruktionen des Kalibrator-Beipackzettels zu erstellen (Art.Nr. SC020K oder SC020L). Dabei sind die genauen Konzentrationen („C“) zu beachten, die für das jeweilige Lot auf dem im Kit enthaltenen Handzettel vermerkt sind. Kalibrationsplasma sollte verdünnt werden wie in der unten stehenden Tabelle beschrieben. Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen innerhalb einer Stunde zu überprüfen, um eine optimale Testleistung zu erzielen.

	Arbeits-Verdünnung	Kalibrator 1	Kalibrator 2	Kalibrator 3	Kalibrator 4	Kalibrator 5
Hirudin / Hoher Messbereich (SC020L) µg/ml	1:20	0	1,25 oder C:4	2,5 oder C:2	3,75 oder 3C:4	5,0 oder C
Hirudin / Niedriger Messbereich (SC020K) µg/ml	1:8	0	0,5 oder C:4	1 oder C:2	1,5 oder 3C:4	2,0 oder C

2. Die Proben und Kontrollen sollten verdünnt werden wie in der nachfolgenden Tabelle beschrieben:

	Kontrolle (Art.Nr.)	Verdünnung mit Puffer	
		Hoher Messbereich	Niedriger Messbereich
Hirudin	SC025K	1:20 (100 µl + 1900 µl Puffer)	1:8 (100 µl + 700 µl Puffer)

Die Verdünnungen müssen innerhalb von einer Stunde getestet werden. Dabei sind die genauen Konzentrationen („C“) zu beachten, die für das jeweilige Lot auf dem im Kit enthaltenen Handzettel vermerkt sind.

3. Für die manuelle Methode wird in ein auf 37°C vorgewärmtes Teströhrchen zugegeben:

Reagenz	Menge
R1: Gepooltes Normalplasma	100 µl
Verdünntes Probenplasma, Kalibrationsplasma oder Kontrollplasma	50 µl
1 Minute bei 37°C inkubieren, dann zugeben und die Zeitmessung starten:	
R2: Bei 37°C vorinkubiertes Thrombin	100 µl
Aufzeichnung der Gerinnungszeit in Sekunden	

#### Automatisierte Methoden:

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

#### QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Testung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht, bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen, die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität von Analyse zu 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 (Hirudin Kontrollplasmen, Art.Nr. SC025K), Argatroban (Argatroban Kontrollplasmen, Art.Nr. SC035K) und Dabigatran (Dabigatran Kontrollplasmen üblicher Bereich, Art.Nr. 224701, und niedriger Bereich, Art.Nr. 225001) 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.

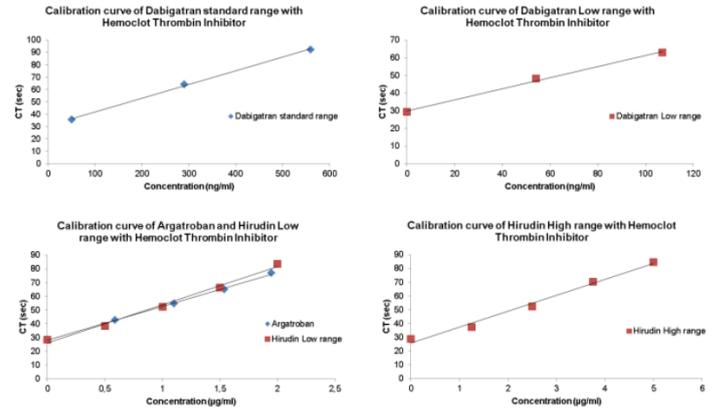
#### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE:

Auf Millimeterpapier wird die Konzentration (ng/ml oder µg/ml) des gemessenen DTI auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Gerinnungszeit auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Die Inhibitor-Konzentration 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, dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



#### TESTCHARAKTERISTIK:

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

Lyophilisierte Probe	Zielwert	Intra-Assay VK %	Inter-Assay VK %
Dabigatran	255 µg/ml	2,2% (N=20)	5,3% (N=20)
Dabigatran (Niedriger Messbereich)	57 µg/ml	1,1% (N=15)	3,7% (N=10)
Argatroban	0,59 µg/ml	2,3% (N=10)	2,2% (N=5)
Hirudin (Niedriger Messbereich)	2,12 µg/ml	2,8% (N=10)	5,0% (N=6)

#### TESTEINSCHRÄNKUNGEN:

Eine Aktivierung der Probe während der Blutentnahme oder Plasmagewinnung kann den Test beeinflussen. Icteriche, 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.

#### 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
- 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.
- Woodhams B, Girardot O, Bianco M-J, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001. Vol 12, No 4. 229-236.