

# BIOPHEN™ DTI

## (Direkte Thrombin-Inhibitoren)



REF 220202

R1 R2 2 x 2,5 mL R3 2 x 25 mL

### Chromogene Methode zur Bestimmung von direkten Thrombin Inhibitoren (DTIs)

#### VERWENDUNGSZWECK:

BIOPHEN™ DTI ist ein chromogener Test zur quantitativen Bestimmung von direkten Thrombin (Faktor IIa)- Inhibitoren (DTIs) wie Dabigatran, Argatroban, Hirudin oder Bivalirudin in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden.

#### ZUSAMMENFASSUNG:

##### Technisch:

Der BIOPHEN™ DTI Kit ist eine chromogene Anti-IIa-Methode, spezifisch für DTIs und insensitive auf Heparine (UFH und LMWH).<sup>2,3</sup>

##### Klinisch:

DTIs wie Dabigatran, Argatroban, Hirudin und Bivalirudin werden in den verschiedensten Zusammenhängen zur Prävention und Behandlung von Thrombosen eingesetzt (z.B. Venenthrombose, Schlaganfall, Embolien, HIT, ...).<sup>1,4</sup>

#### TESTPRINZIP:

BIOPHEN™ DTI ist eine chromogene Methode, bei der in Überschuss zugesetztes Thrombin (FIIa) durch in der Probe enthaltene DTIs gehemmt wird. Das verbleibende Thrombin hydrolysiert daraufhin das Thrombin-spezifische chromogene Substrat (CS-01(81)) und setzt dabei den Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) frei. Die Menge des freigesetzten pNA (gemessen durch Absorption bei 405 nm) ist damit umgekehrt proportional zur DTI-Konzentration in der Probe.

[DTI] + [FIIa (Überschuss)] → [FIIa - DTI] + [FIIa (Rest)]

[FIIa (Rest)] + Substrat → Peptid + pNA

#### IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

**R1 Thrombin-spezifisches chromogenes Substrat (CS-01(81)):** lyophilisiert mit Stabilisatoren. Enthält eine Heparin neutralisierende Substanz und einen Fibrinpolymerisations-Inhibitor.

**R2 Thrombin (FIIa):** gereinigt, lyophilisiert mit Stabilisatoren. Enthält BSA.

**R3 Tris-BSA-Puffer:** Tris-NaCl Reaktions-Puffer gebrauchsfertig. Enthält BSA und geringe Mengen Natriumazid (0,9 g/L).

R1 R2 2 Flaschen mit je 2,5 mL

R3 2 Flaschen mit je 25 mL

#### ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Plasma, das für die Präparation der Reagenzien benötigt wird, ist durch approbierte Methoden auf HIV und Hepatitis B getestet. Keine Testmethode ist jedoch in der Lage, die Abwesenheit von Infektionsquellen vollends auszuschließen. Daher müssen alle Produkte biologischen Ursprungs mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Dieses Produkt ist für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt.

#### VORBEREITUNG DER REAGENZIEN:

Die Flaschen sind unter Vakuum verschlossen. Die Gummistopfen sind vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden.

R1 R2 Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 2,5 mL aqua dest. rekonstituieren. Bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen und dabei Schaumbildung vermeiden. Direkt in das Analysegerät laden und Applikationsanweisung beachten.

Für manuelle Methoden 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen. Vor Gebrauch homogenisieren.

R3 Gebrauchsfertig. Homogenisieren und gemäß Applikationsanweisung direkt in das Analysegerät laden. Für manuelle Methoden 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen. Vor Gebrauch homogenisieren.

#### LAGERUNG UND STABILITÄT:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden. Unter diesen Voraussetzungen können diese bis zum auf der Verpackung aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden.

R1 R2 Stabilität des in der Originalflasche oder in einem geschlossenen Kunststoffbehälter gelagerten, geöffneten Reagenz unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 4 Wochen bei 2-8°C.
- 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 2 Monate bei -20°C.
- Die Stabilität im Analysegerät ist von der spezifischen Applikation abhängig.

Gefrorenes Reagenz einmal bei 37°C auftauen und sofort verwenden.

R3 Stabilität des in der Originalflasche oder in einem geschlossenen Kunststoffbehälter gelagerten, geöffneten Reagenz unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 8 Wochen bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Die Stabilität im Analysegerät ist von der spezifischen Applikation abhängig.

Sollte das Substrat gelblich verfärbt sein, so deutet dies auf eine Kontamination hin. Das Fläschchen ist zu entsorgen.

#### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

##### Reagenzien:

- Aqua dest., vorzugsweise steril.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Referenzmaterial für den zu untersuchenden DTI: interne Standards, pharmazeutische Aufbereitung oder kommerzielle Kalibratoren und Kontrollen mit bekannter Konzentration wie:

Kalibratoren	BIOPHEN™ Dabigatran Kalibrator Niedrig / Hoch	BIOPHEN™ Argatroban Kalibrator	Plasma Hirudin Kalibrator Niedrig / Hoch	BIOPHEN™ Bivalirudin Kalibrator
Referenz	222901 / 222801	SC030K	SC020K / SC020L	226701
Kontrollen	BIOPHEN™ Dabigatran Kontrolle Niedrig / Hoch	BIOPHEN™ Argatroban Kontrolle	Plasma Hirudin Kontrolle	BIOPHEN™ Bivalirudin Kontrolle
Referenz	224701 / 225001	SC035K	SC025K	225701

Beachten Sie auch die spezifischen Applikationsanleitungen für das verwendete Analysegerät.

##### Geräte:

- Spektrophotometer oder Gerinnungsautomaten zur Bestimmung chromogener Tests.
- Stoppuhr, geeichte Pipetten.

#### PROBENGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind im CLSI Dokument H21-A5 veröffentlicht).

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Gerinnungsaktivierung vermieden werden muss. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.

Lagerung von Plasmen siehe Referenzen <sup>5,6</sup>.

#### TESTDURCHFÜHRUNG:

BIOPHEN™ DTI wurde als kinetische Methode zur Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt, kann aber auch manuell und als Endpunkt-Methode durchgeführt werden. Der Test wird bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

#### Testmethode (Manuelle Methode):

1) Die Kalibratoren und Kontrollen sind gemäß den jeweiligen Packungsbeilagen zu rekonstituieren. Kalibratoren werden mit R3 Puffer gemäß unten stehender Tabelle verdünnt:

Kalibrator	Referenz	Verdünnung in R3
BIOPHEN™ Dabigatran Plasma Kalibrator Hoch	222801	1 : 10
BIOPHEN™ Dabigatran Kalibrator Niedrig	222901	1 : 2
BIOPHEN™ Bivalirudin Kalibrator	226701	1 : 2
BIOPHEN™ Argatroban Kalibrator	SC030K	1 : 4

Hirudin: Kalibratoren gemäß unten stehender Tabelle in R3 Puffer verdünnen:

Niedriger Bereich Hirudin (SC020K)	µg/mL:	0	0,5	1	1,5	2
Plasma mit 2 µg/mL Hirudin (µL)		0	25	50	75	100
Plasma mit 0 µg/mL Hirudin (µL)		100	75	50	25	0
R3 Puffer		900	900	900	900	900

Hoher Bereich Hirudin (SC020L)	µg/mL:	0	1,25	2,5	3,75	5
Plasma mit 5 µg/mL Hirudin (µL)		0	25	50	75	100
Plasma mit 0 µg/mL Hirudin (µL)		100	75	50	25	0
R3 Puffer		2400	2400	2400	2400	2400

2) Proben und Kontrollen gemäß unten stehender Tabelle in R3 Puffer verdünnen:

Kontrolle / Probe	Referenz	Verdünnung in R3
BIOPHEN™ Dabigatran Kontrolle Hoch	224701	1 : 10
BIOPHEN™ Dabigatran Kontrolle Niedrig	225001	1 : 2
Probe		1 : 10 (Hoher Bereich) 1 : 2 (Niedriger Bereich)
Kontrolle / Probe	Referenz	Verdünnung in R3
BIOPHEN™ Argatroban Kontrolle	SC035K	1 : 4
Probe		1 : 4
Kontrolle / Probe	Referenz	Verdünnung in R3
BIOPHEN™ Bivalirudin Kontrolle	225701	1 : 2
Probe		1 : 2
Kontrolle / Probe	Referenz	Verdünnung in R3
Plasma Hirudin Kontrolle	SC025K	Hoher Bereich
		Niedriger Bereich
Probe		1 : 25 1 : 10

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen zu überprüfen. Verdünnte Proben sollten innerhalb von 2 Stunden getestet werden, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert werden (18-25°C).

Es sind die genauen Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollen zu beachten, die für die jeweilige Charge auf dem im Kit enthaltenen Zertifikat vermerkt sind.

3) In ein bei 37°C vorinkubiertes Teströhrchen oder eine Mikrotiterplatte wird nach folgendem Schema zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Röhrchen
Kalibratoren, Testplasma oder Kontrollen	50 µL	200 µL
<b>R1</b> Substrat	50 µL	200 µL
Mischen und <b>2 Minuten bei 37°C</b> inkubieren, dann zugeben:		
<b>R2</b> Thrombin (FIIa) präinkubiert bei 37°C	50 µL	200 µL
Mischen und <b>exakt 2 Minuten bei 37°C</b> inkubieren.		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (2%) oder Essigsäure (20%)*	100 µL	400 µL
Mischen und Messung der Absorption <b>bei 405 nm</b> gegen den entsprechenden Probenleerwert.**		

\* Die gebildete Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

\*\* Ein Probenleerwert wird erstellt, falls die Probe ikterisch, lipämisch, hämolytisch ist, oder eine auffällige Färbung aufweist. Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Reihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (2%), **R2**, **R1**, verdünnte Probe. Falls die verwendete Methode andere Reagenzvolumente als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen genau eingehalten werden, um eine optimale Testleistung zu gewährleisten. Der Anwender ist für die Validierung jeglicher Änderungen und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse verantwortlich.

**Kinetische Methode:**

Der Test kann auch mit kinetischen Methoden ausgewertet werden. In diesem Fall wird die Farbentwicklung von 10 bis 100 Sekunden, im Anschluss an die Substratzugabe (ΔA405) gemessen. Es ist nicht nötig, den Leerwert abzuziehen oder die Reaktion zu stoppen.

**Für automatisierte Methoden sind Applikationsanleitungen erhältlich. Die spezifischen Applikationsanleitungen und Warnhinweise für das jeweilige Analysegerät sind zu beachten.**

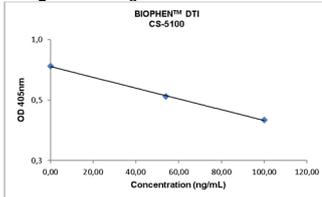
**KALIBRATION:**

Der BIOPHEN™ DTI kann für die Messung von DTIs wie Argatroban, Dabigatran, Hirudin und Bivalirudin kalibriert werden. Entsprechende Kalibrationsplasmen sind gesondert erhältlich. (Siehe dazu den Absatz „Erforderliche Materialien, die nicht im Kit enthalten sind“)

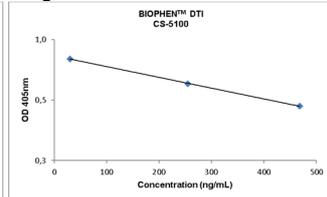
Kalibrationsbereich	Niedriger Bereich:	Hoher Bereich:
Dabigatran	0 - 100 ng/mL	0 - 500 ng/mL
Hirudin	0 - 2 µg/mL	0 - 5 µg/mL
Argatroban		0 - 2 µg/mL
Bivalirudin		0 - 5 µg/mL

Die unten gezeigten Kalibrationskurven dienen lediglich als Beispiele. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analyseserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.

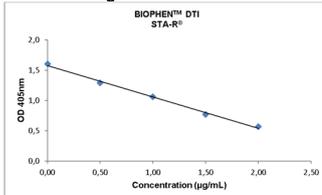
Dabigatran Niedriger Bereich



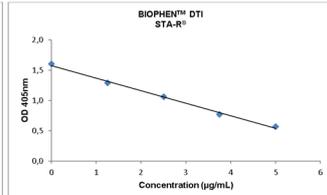
Dabigatran Hoher Bereich



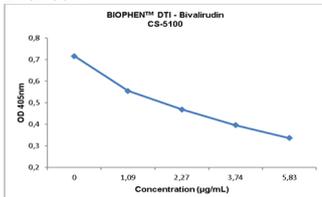
Hirudin Niedriger Bereich



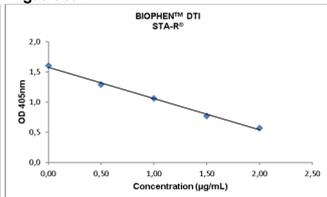
Hirudin Hoher Bereich



Bivalirudin



Argatroban



**QUALITÄTSKONTROLLE:**

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Gebrauch der gleichen Reagenzchargen die Validierung der Methodenkonformität und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse. Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen. Zumindest bei Chargenwechsel, Wartungsarbeiten am Analysegerät oder wenn die Kontrollen außerhalb des Vertrauensbereiches liegen, muss eine Neukalibration erfolgen.

Jedes Labor sollte die Richtigkeit der Zielwerte und Akzeptanzbereiche unter den eigenen Testbedingungen überprüfen.

**ERGEBNISSE:**

- Bei der manuellen Endpunkt-Methode wird die DTI-Konzentration (z.B. ng/mL) auf der x-Achse (Abszisse) gegen die korrespondierende Absorption (A405 / OD 405 nm) auf der y-Achse (Ordinate) aufgetragen.
  - Dabigatran:** Lineare Regression auf lin/log-Skala (ng/mL - OD)
  - Argatroban:** Lineare Regression auf lin/log-Skala (µg/mL - OD)
  - Hirudin:** Lineare Regression auf lin/lin-Skala (µg/mL - OD)
  - Bivalirudin:** Kubische Regression (Polynom 3. Ordnung auf lin/lin-Skala (µg/mL - OD))
- Die Ergebnisberechnung bei der kinetischen Methode erfolgt entsprechend durch Auftragung der ΔA405-Werte anstelle der A405-Werte.
- Die DTI-Konzentration in der Probe wird bei Verwendung der Standardverdünnung von der Kalibrationskurve abgelesen.
- Die Resultate sind in ng/mL für Dabigatran bzw. in µg/mL für Argatroban, Hirudin und Bivalirudin angegeben.
- Die Einstellungen der automatisierten Methode können von den oben beschriebenen Angaben abweichen und sind in der jeweiligen gerätespezifischen Applikationsanleitung angeführt.
- Werden andere Verdünnungen verwendet, so ist die erhaltene Konzentration mit dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

**EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:**

- Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden.
- Jegliches Reagenz mit unüblicher Erscheinung oder Anzeichen von Kontamination muss verworfen werden.
- Jede verdächtige Probe z.B. jene mit Anzeichen für Aktivierung müssen verworfen werden.
- Plasmen, die Gerinnsel oder Anzeichen für Kontaminationen aufweisen, sind zu verwerfen.
- Proben mit hoher Konzentration können in gepooltem Normalplasma verdünnt werden. Die gemessenen Konzentrationen sind dann mit dem komplementären Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

**ERWARTETE WERTE:**

Dabigatran, Argatroban, Hirudin und Bivalirudin sind im normalen Plasma abwesend. Normaler Bereich, therapeutischer Bereich und Blutungsrisikobereich sind anhand der aktuellen lokalen Vorgaben zu definieren.

**LEISTUNGSMERKMALE:**

- Die untere Nachweisgrenze und der Messbereich sind vom verwendeten Analysesystem abhängig.
- Der Messbereich für Dabigatran ist vom verwendeten Analysesystem abhängig (zwischen 15 und 120 ng/mL (niedriger Bereich) oder 20 bis 500 ng/mL (hoher Bereich) auf CS oder STA Serie).
- Der Messbereich für **Argatroban** beträgt etwa 0-2 µg/mL.
- Der Messbereich von **Hirudin** ist vom verwendeten Analysesystem abhängig (z.B. 0,15 bis 2 µg/mL (niedriger Bereich) oder 0,3 bis 5 µg/mL (hoher Bereich)).
- Der Messbereich von **Bivalirudin** ist vom verwendeten Analysesystem abhängig (z.B. 0,5 bis 15 µg/mL).
- Leistungsstudien wurden intern unter Einsatz einer Reagenzcharge parallel auf der Sysmex CS-Serie und der STA-Serie durchgeführt. Die Messwerte wurden mit Qualitätskontrollen des Labors ermittelt, wobei folgende Ergebnisse erhalten wurden.

Kontrolle	Intra Assay			Inter Assay		
	N	Mittelwert	CV%	N	Mittelwert	CV%
Dabigatran Niedriger Bereich 1	6	28,8 ng/mL	5,3	8	23,4 ng/mL	10,7
Dabigatran Niedriger Bereich 2	6	86,2 ng/mL	4,1	8	79,4 ng/mL	3,0
Dabigatran Hoher Bereich 1	6	111,2 ng/mL	1,4	6	110,8 ng/mL	7,1
Dabigatran Hoher Bereich 2	6	280,5 ng/mL	2,4	6	281,8 ng/mL	2,4
Argatroban Level 1	8	0,65 µg/mL	1,28	8	0,65 µg/mL	3,0
Argatroban Level 2	8	1,53 µg/mL	2,5	8	1,27 µg/mL	3,1
Hirudin Level 1	10	1,00 µg/mL	4,8	4	1,26 µg/mL	< 5
Hirudin Level 2	10	2,00 µg/mL	1,5	4	2,16 µg/mL	< 5
Bivalirudin Level 1	40	1,62 µg/mL	0,7	10	1,64 µg/mL	2,4
Bivalirudin Level 2	40	3,95 µg/mL	0,7	10	4,10 µg/mL	2,7

Korrelation mit der Referenzmethode (BIOPHEN™ vs LC: MS/MS):

n = 101; y = 0,926x + 10,46; r = 0,987

Bei üblichen Konzentrationen ist der Test unempfindlich auf Heparine (UFH, LMWH).

**REFERENZEN:**

- Greinacher A, Warkentin T, The direct thrombin inhibitor hirudin, *Thromb Haemost*; 99: 819–829; 2008.
- Schramm et al, Development of a chromogenic substrate for the determination of hirudin in plasma, *Blood Coagul fibrinolysis*, 2(1):121-7, 1991.
- Amiral J et al. An update on laboratory measurements of Dabigatran: Smart specific and calibrated dedicated assays for measuring anti-IIa activity in plasma. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016.
- Poli et al. Diagnostic accuracy of a novel chromogenic direct thrombin inhibitor assay: clinical experiences for Dabigatran monitoring. *Thromb Haemost*. 2017.
- 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, Girardot O, Blanco M-J, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood coagulation and Fibrinolysis*. 2001.

**SYMBOLLE:**

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Symbolerklärungs-Blatt ist zu beachten.