



BIOPHEN® DTI (Direkte Thrombin-Inhibitoren)

Art.Nr. 220202 (2x2,5 mL)

Chromogene Methode zur Bestimmung von
direkten Thrombin (Faktor IIa)-Inhibitoren (DTIs)



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

Version: 2017/02/15

VERWENDUNGSZWECK:

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

ZUSAMMENFASSUNG:

Die Bestimmung der DTI-Spiegel im Plasma erlaubt die Überwachung einer Therapie mit DTIs und die Anpassung der Dosierung unter bestimmten klinischen Umständen (d.h. vor einem dringenden operativen Eingriff, bei Patienten mit dem Risikofaktor schwerer Blutungen, bei Patienten mit thromboembolischen Vorfällen oder bei einem Verdacht auf Überdosierung).

TESTPRINZIP:

BIOPHEN® DTI ist eine chromogene Methode, die auf der Hemmung einer konstanten Menge an zugesetztem Thrombin (FIIa) durch den zu testenden DTI und anschließender Spaltung eines FIIa-spezifischen chromogenen Substrates durch den restlichen FIIa basiert. Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) freigesetzt. Die Menge des freigesetzten pNA korreliert mit der FIIa-Restaktivität. Die Farbentwicklung, gemessen 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: Reagenz 1: Thrombin (FIIa) Substrat

2 Flaschen mit je 2,5 mL chromogenem Thrombin (FIIa)-Substrat CS-01(81) mit Stabilisatoren lyophilisiert. Enthält einen Fibrinpolymerisations-Inhibitor.

R2: Reagenz 2: Thrombin (FIIa)

2 Flaschen mit je 2,5 mL humanem Thrombin (FIIa), mit Stabilisatoren lyophilisiert.

R3: Reagenz 3: Tris-BSA-Puffer

2 Flaschen mit je 25 mL gebrauchsfertigem Tris-NaCl Reaktions-Puffer, enthält 1% BSA und Natriumazid als Konservierungsmittel. Enthält als Konservierungsmittel Natriumazid in geringer Konzentration (0,9 g/l), der unten aufgeführte Warnhinweis ist zu beachten.

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Thrombin (FIIa) wird durch Aktivierung von Prothrombin aus humanem Plasma aufgereinigt, welches mit registrierten Methoden getestet und als negativ für HIV-, HBs-Ag und HCV-Antikörper eingestuft wurde. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde aus bovinem Plasma hergestellt, das auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren hergestellt wurde. Kein Test kann jedoch mit absoluter Sicherheit die Anwesenheit infektiöser Substanzen ausschließen.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren.
- Falls das Substrat eine Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche muss verwendet werden.
- Bei Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden. Es dürfen bei Durchführung des Tests keine Reagenzien aus Packungen mit unterschiedlichen Chargennummern gemischt werden, da die Reagenzien für die jeweilige Chargennummer der Packung optimiert sind.
- Die FIIa-Konzentration wird lotspezifisch angepasst, um die korrekte Reaktivität im Test zu gewährleisten.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu handhaben, um jegliche Kontamination während des Gebrauchs zu vermeiden. Die Verdunstung ist während des Reagenzgebrauchs durch Verringerung der Verdunstungsoberfläche so gering wie möglich halten. Verdunstung verringert die Reagenzstabilität in Analysenautomaten.
- Die im Kit enthaltenen Flaschen werden unter Vakuum verschlossen. Um einen Verlust deren Inhalts beim Öffnen zu vermeiden, müssen die Verschlüsse vorsichtig entfernt werden.
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Bei hoch-lipidischen, -ikterischen oder -hämolytischen Plasmen sowie für Plasmen, deren Färbung abweicht, sind Probenleerwerte zu messen.
- Zur in-vitro-Diagnostik

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

R1: Reagenz 1: Thrombin (FIIa)-spezifisches chromogenes Substrat (CS-01(81))

R2: Reagenz 2: Humanes Thrombin (FIIa)

Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 2,5 mL aqua dest. rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen und dabei gelegentlich schütteln. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren. Mindeststabilität des in der Originalflasche gelagerten, geöffneten Reagenz unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:

- 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- 4 Wochen bei 2-8°C
- 2 Monate bei ≤ -20°C*

* Plasma kann einmalig gefroren und aufgetaut werden (so schnell wie möglich einfrieren). Bei 37°C auftauen, wobei die Dauer an die Plasmavolumina anzupassen ist. Die Stabilität des aufgetauten Reagenz ist unter den Arbeitsbedingungen des jeweiligen Labors zu prüfen.

R3: Reagenz 3: Tris-BSA-Puffer

Gebrauchsfertig. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stabilisieren lassen. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

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

- 8 Wochen bei 2-8°C
- 1 Woche bei Raumtemperatur (18-25°C)
- Nicht einfrieren

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf der Verpackung aufgedruckten Verfalldatum stabil.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Aqua dest., vorzugsweise steril.
- 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
- Kalibrationsplasmen, titriert für den zu bestimmenden direkten Thrombin (Faktor IIa)-Inhibitor, z.B.:
 - Argatroban (Argatra®) Kalibrationsplasmen (Art.Nr. SC030K)
 - Dabigatran (Pradaxa®) Kalibrationsplasmen (Art.Nr. 222801),
 - Dabigatran (Pradaxa®) Kalibrationsplasmen (niedrig) (Art.Nr. 222901),
 - Hirudin Kalibrationsplasmen (niedrig) (Art.Nr. SC020K)
 - Hirudin Kalibrationsplasmen (hoch) (Art.Nr. SC020L)
- Kontrollplasmen, titriert für den zu bestimmenden DTI, z.B.:
 - Argatroban Kontrollplasmen (Art.Nr. SC035K),
 - Dabigatran (Pradaxa®) Kontrollplasmen (Art.Nr. 224701),
 - Dabigatran (Pradaxa®) Kontrollplasmen (niedrig) (Art.Nr. 225001),
 - Hirudin Kontrollplasmen (Art.Nr. SC025K).
- Internationale Standards oder interne pharmazeutische Referenzmaterialien, die für die Bestimmung von DTIs zur Verfügung stehen

Geräte:

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

PROBENGEWINNUNG:

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

- Proben: Humanes Plasma mit Tri-Natrium Citrat als Antikoagulant.
- Blutabnahme: 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.
- Zentrifugation: Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2000g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.
- Lagerung der Plasmaproben bis zu:
 - 4 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
 - 2 Monate tiefgefroren bei -20°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C zügig aufgetaut, gut durchmischt und dann sofort getestet werden. Jegliche Ablagerungen sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

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

Automatisierte Methoden:

Anleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich.

Bestimmung von Argatroban und Dabigatran:

1) Kalibratoren und Kontrollen gemäß deren Packungsbeilage vorbereiten. Kalibrationsplasma sollte verdünnt werden wie in der unten stehenden Tabelle beschrieben.

2) Proben, Kontrollen und Kalibratoren wie nachfolgend angeführt verdünnen:

Test	Kalibrator (Art.Nr.)	Proben-Verdünnung in R3	Kontrolle (Art.Nr.)
Dabigatran	222801	1/10	224701
Dabigatran (Niedrig)	222901	1/2	225001
Argatroban	SC030K	1/4	SC035K

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen innerhalb einer Stunde zu überprüfen. 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 präinkubiertes Kunststoffröhrchen nach folgendem Schema hinzufügen:

Reagenz	Menge
Kalibratoren, Testplasma oder Kontrollen (mit R3 verdünnt)	200 µL
R1 Substrat	200 µL
Mischen und 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:	
R2 Thrombin (FIIa) präinkubiert bei 37°C	200 µL
Mischen und exakt 2 Minuten bei 37°C inkubieren.	
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:	
Zitronensäure (2 %)*	400 µL
Mischen und Messung der Absorption bei 405 nm gegen den entsprechenden Probenleerwert.	

* Oder Essigsäure (20%). Die gebildete Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert bei der Endpunktbestimmung wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Essigsäure (20%), Zitronensäure (2%), Thrombin (FIIa), Substrat, verdünnte Probe. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Bestimmung von Hirudin:

1) Kalibratoren und Kontrollen gemäß deren Packungsbeilage vorbereiten. Kalibrationsplasma sollte verdünnt werden wie in der unten stehenden Tabelle beschrieben.

Niedriger Bereich Hirudin Verdünnung 1 :10	µg/mL	0	0,5	1	1,5	2
Hirudin Kalibrationsplasma (niedrig) (Art.Nr. SC020K) (µL)		0	25	50	75	100
Normalplasma (µL)		100	75	50	25	0
Puffer R3		900	900	900	900	900

Hoher Bereich Hirudin Verdünnung 1 :25	µg/mL	0	1,25	2,5	3,75	5
Hirudin Kalibrationsplasma (hoch) (Art.Nr. SC020L) (µL)		0	25	50	75	100
Normalplasma (µL)		100	75	50	25	0
Puffer R3		2400	2400	2400	2400	2400

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen innerhalb einer Stunde zu überprüfen.

2) Proben und Kontrollen sind wie nachfolgend angeführt mit Reagenz 3 (Puffer) verdünnen:

Test	Kontrolle (Art.Nr.)	Verdünnung in Reagenz 3	
		"hoher" Bereich	"niedriger" Bereich
Hirudin	SC025K	1/25	1/10
		100 µL + 2400 µL	100 µL + 900 µL

Die Kalibrationskurve ist zu erstellen und mittels Qualitätskontrollen innerhalb einer Stunde zu überprüfen. Es sind die genauen Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollen zu beachten, die für das jeweilige Lot auf dem im Kit enthaltenen Zertifikat vermerkt sind.

3) In ein bei 37°C präinkubiertes Kunststoffröhrchen nach folgendem Schema hinzufügen:

Reagenz	Mikrotiterplatte	Röhrchen
Kalibratoren, Testplasma oder Kontrollen (mit R3 verdünnt)	50 µL	200 µL
R1 Substrat	50 µL	200 µL
Mischen und 2 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben:		
R2 Thrombin (FIIa), präinkubiert bei 37°C	50 µL	200 µL
Mischen und exakt 2 Minuten bei 37°C inkubieren.		
Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:		
Zitronensäure (2 %)*	100µL	400 µL
Mischen und Messung der Absorption bei 405 nm gegen den entsprechenden Probenleerwert.		

*Oder Essigsäure (20%). Die gebildete Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil.

Der Probenleerwert bei der Endpunktbestimmung wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Essigsäure (20%), Zitronensäure (2%), Thrombin (FIIa), Substrat, verdünnte Probe. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

Kinetische Methode:

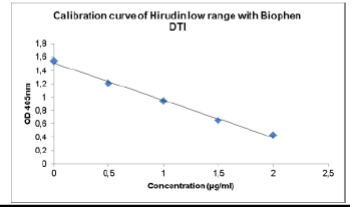
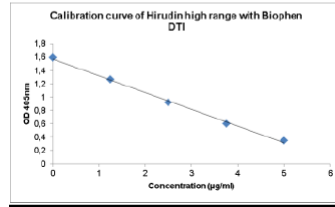
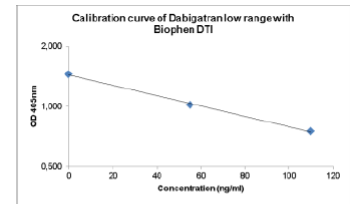
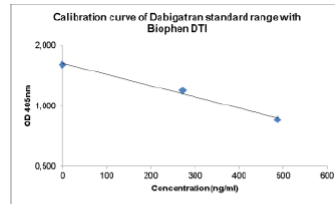
Der Test kann auch kinetisch ausgewertet werden. In diesem Fall wird die Farbentwicklung von 10 bis 100 Sek. im Anschluss an die Substratzugabe gemessen. In diesem Fall ist es nicht nötig den Leerwert abzuziehen oder die Reaktion zu stoppen. Die Ergebnisse werden in der Änderung der Farbentwicklung (ΔA405) für Standard- und Probenmaterial erhalten.

KALIBRATION:

Der Test kann für die Messung von Argatroban, Dabigatran und Hirudin kalibriert werden. Entsprechende Kalibrationsplasma sind erhältlich. Bei den unten gezeigten Kalibrationskurven handelt es sich lediglich um ein Beispiel, das mit der manuellen Methode erstellt wurde. Zur Bestimmung der DTI-Konzentration darf ausschließlich eine selbst erstellte Kalibrationskurve des jeweiligen DTIs verwendet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasma ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen die Validierung der Kalibrationskurve 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, größeren Wartungsarbeiten am Analysenautomaten 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 Endpunktmethode wird die DTI-Konzentration (z.B. ng/mL) auf der x-Achse (Abszisse) gegen die korrespondierende Absorption (A405) auf der y-Achse (Ordinate) aufgetragen.
 - Argatroban und Dabigatran: Lin-Log-Skala nutzen (µg/mL)
 - Hirudin: Lin-Lin-Skala nutzen (µg/mL)

Die Ergebnisberechnung bei der kinetischen Methode erfolgt entsprechend, durch Auftragung der ΔA405-Werte anstelle der A405-Werte.

- Die DTI-Konzentration in der Probe wird von der Kalibrationskurve abgelesen.
- Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.
- Die Einstellungen der automatisierten Methode können von den oben beschriebenen Angaben abweichen und sind im der jeweiligen gerätespezifischen Applikation angeführt.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um die optimale Testleistung zu erzielen, muss die Durchführungsanleitung genau befolgt werden.
- Reagenzien mit ungewöhnlichem Aussehen oder einem Zeichen von Kontamination sind zu verwerfen. Plasmen mit einem Gerinnsel oder einer Kontamination sind zu verwerfen. Plasmen mit ungewöhnlichem Aussehen sind zu verwerfen.
- Proben mit hoher Konzentration können in gepooltem Normalplasma verdünnt werden. Die gemessenen Konzentrationen sind dann mit dem komplementären Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Aktivierung der Gerinnung bei der Probengewinnung und Aufarbeitung muss vermieden werden.

ERWARTETE WERTE:

Argatroban, Dabigatran und Hirudin sind im normalen Plasma abwesend. Normaler Bereich, therapeutischer Bereich und Blutungsbereich sind anhand der aktuellen lokalen Vorgaben zu definieren. Die Ergebnisse sind orientiert am klinischen und biologischen Zustand des Patienten zu interpretieren.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Der Messbereich beträgt für Dabigatran niedriger Bereich etwa 0-120 ng/mL und für den Standard-Bereich 0-500 ng/mL.
- Der Messbereich für Argatroban beträgt etwa 0-2 µg/mL.
- Der niedrige Messbereich beträgt für Hirudin etwa 0-2 µg/mL und für den hohen Messbereich 0-5 µg/mL.
- Die analytische Sensitivität beim Dabigatran beträgt für den „niedrigen“ Bereich 6,3 ng/mL und für den Standard-Bereich 14,6 ng/mL. Für Hirudin wurde eine analytische Sensitivität von 0,15 µg/mL für den niedrigen Bereich und 0,30 µg/mL für den hohen Bereich festgelegt. Dieser Test wurde entwickelt, um Interferenzen mit Plasmafaktoren zu minimieren.
- Der Test enthält einen Heparin-Neutralisator, der bis zu einer Konzentration von 2 IU/mL unfraktioniertem Heparin (UFH) oder niedermolekularem Heparin (LMWH) eine Messung der DTIs zulässt.
- Zeitverzögernd wirkende Thrombin (Faktor IIa)-Inhibitoren können aufgrund der kurzen Inkubationszeit vernachlässigt werden.

Beispiel der Reproduzierbarkeit gemessen auf einem STA-R®:

	µg/mL Hirudin	Intra Assay VK% (N=10)	Inter Assay VK% (N=4)
Probe 1	1,1	4,8	<5
Probe 2	2,1	1,5	<5

	ng/mL Dabigatran	Intra Assay VK% (N=6)
Dabigatran Standard-Bereich	304,4	1,54%
Dabigatran niedriger Bereich	78,9	2,05%

Der Biophen® DTI Test zeigt eine gute Korrelation mit dem Hemoclot Thrombin Inhibitor Test. Gemessen wurde Hirudin auf einem STA-R® System. (N=42; r²=0,98).

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.
- 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.