

# BIOPHEN DTI

## Ref. A220202

Quantitative determination of Direct Thrombin Inhibitors (DTI) with a chromogenic method.

In vitro research use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 29/08/2008

### INTENDED USE:

BIOPHEN DTI kit is a quantitative assay for measuring the anti-IIa activity of hirudin and other Direct Thrombin Inhibitors (DTIs) in human citrated plasma, using a chromogenic method, manual or automated.

### CLINICAL APPLICATIONS:

Preventive or curative indications of Hirudin and other DTIs: quantitative determination of the anti-IIa activity in patients' plasma is an aid for monitoring the therapy and adjusting drug dosage.

### ASSAY PRINCIPLE:

Biophen DTI is a kinetics method based on the inhibition of a constant and in excess amount of Thrombin (FIIa), by the tested hirudin or DTI, and hydrolysis of a Thrombin specific chromogenic substrate, by the Thrombin in excess. pNA is then released from the substrate. The amount of pNA released is then a relation of the residual Thrombin activity. There is an inverse linear relationship between the concentration of hirudin (or DTI) and color development, measured at 405 nm.

[DTI] + [FIIa (excess)] → [FIIa-DTI] + [residual FIIa]  
[FIIa (residual)] + Substrate → Peptide + pNA

### SPECIMEN:

Plasma prepared from citrated anticoagulated blood, where hirudin (or any other direct thrombin inhibitor) activity must be measured.

### REAGENTS:

#### R1: Reagent 1: Thrombin Substrate

Thrombin specific chromogenic substrate (CS-01(81)), lyophilised in presence of stabilizers, of an heparin neutralizing substance, and of a fibrin polymerization inhibitor.  
2 vials (to be reconstituted with 2.5 mL of distilled water).

#### R2: Reagent 2: Thrombin

Purified human thrombin, lyophilised, in presence of stabilizers.  
2 vials (to be reconstituted with 2.5 mL of distilled water).

#### R3: Reagent 3: Tris-BSA Buffer

Tris NaCl reaction Buffer, pH 8.40, containing 1% BSA, and sodium azide as preservative.

Ready to use.  
2 vials of about 25 mL.

#### Warning:

-Purified thrombin was prepared by activation of prothrombin extracted from human plasma, which was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. Bovine Serum Albumin (BSA) was prepared from bovine plasma, which was tested for the absence of infectious agents, and collected from animals free from BSE. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of biological origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.  
- Sodium azide (0.9 g/l) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Flush with large volumes of water when discarding into a sink.  
- This assay was optimized for minimizing any possible interference for heparinized samples.  
- The thrombin concentration is adjusted for each lot for providing the right reactivity in the assay

### REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

#### Reagents:

- Distilled water, preferentially sterile.
- Acetic Acid (20%) or Citric Acid (2%) (End point method).
- Plasma Calibrator titrated for hirudin (eg: **Plasma Hirudin Standard Low (# ASC020K)** or **High (# ASC020L)**) Or Reference material for the DTI to be assayed (international or internal, pharmaceutical preparation...).
- Quality Control Plasmas titrated for hirudin (eg: **Plasma Hirudin Control (# ASC025K)** or for the DTI to be assayed.

#### Material:

- Spectrophotometer, photometer or automates for chromogenic assays, with a wave-length set up at 405 nm.
- Stop watch.
- Calibrated pipettes.

### TRACEABILITY TO THE REFERENCE MATERIAL:

Internal reference for Hirudin, or standard pharmacopoeia preparations (when available) or pharmaceutical preparations, diluted into plasma.

### STORAGE CONDITIONS:

Reagents must be stored at 2-8°C, in their original packaging box. They are then stable until the expiration date printed on the box.

**Note:** Stability studies for 3 weeks at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature for a short period without damage.

### PREPARATION AND STABILITY OF REAGENTS:

**Note:** Reconstitution volumes can vary according to the automate used. Refer to each specific instrument adaptation.

#### R1: Reagent 1: Thrombin specific chromogenic substrate

- Reconstitute each vial with 2.5 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex).
- Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time.
- Homogenize the content before each use.

Stability of restored reagent R1, kept in its original vial:

- 72 hours at 2-8°C.
- 24 hours at room temperature (18-25 °C).
- 2 months at -20°C or below.

#### R2: Reagent 2: Thrombin

- Reconstitute each vial with 2.5 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex).
- Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time.
- Homogenize the content before each use.

Stability of restored reagent R2, kept in its original vial:

- 72 hours at 2-8°C.
- 24 hours at room temperature (18-25 °C).
- 2 months at -20°C or below.

#### R3: Reagent 3: Tris-BSA Buffer

Ready to use buffer. Shake before use.

Stability of the buffer, protected from any bacterial contamination:

- In its original vial, until the expiration date printed on the label, at 2-8°C.
- When open, 7 days at 2-8 °C

#### Cautions:

- In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use (yellow cap for R1, white cap for R2, and white cap for buffer R3).
- Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination during use.
- If the substrate becomes yellow, this indicates the presence of a contaminant. It must be rejected, and a new vial must be used.

#### Note:

- R1 and R2 vials are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any lost of powder when opening the vials.
- According to the automated method used, the reagents can be reconstituted with volumes different from those recommended. In any case, the established reactive ratios (respective reagent concentrations in the reactive milieu) between R1 and R2 must be adhered to.
- Use only reagents from kits with the same lot number. Do not mix reagents from kits with different lots when running the assay. Reagents R1 and R2 are optimized for each lot of kits.

### TESTED SPECIMEN:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M (or 0.129M) trisodium citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma must be tested within 4 hours when stored at room temperature (18-25°C), or it can be frozen at -20°C or below for up to 1 month. Just before use, the plasma must be thawed for 15 min. in a water bath at 37°C.

**Note:** Refer to GEHT or CLSI recommendations for further instructions on specimen collection, handling and storage. Discard any plasma presenting an unusual aspect (haemolysed, lipaemic aspect...).

### TEST PROCEDURE:

Biophen DTI kit is designed for being used with automated kinetics methods but it can also be used for end point manual methods. Adaptations to the various automates are available upon request. The assay is performed at the controlled temperature of 37°C and the colour development is measured at 405 nm.

D.750.02/BI/0202



6560 Gove Court · Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

#### CALIBRATION:

According to the expected hirudin (or DTI) concentration in tested plasma, the "low range" or the "high range" protocol must be used.

**Note:** Calibration of the assay can be performed with normal plasma supplemented with hirudin or with the Plasma Hirudin Standard Low (# ASC020K) and Plasma Hirudin Standard High (# ASC020L) kits (low or high range). When other direct thrombin inhibitors are used, a calibration curve can be prepared by spiking the inhibitor in normal plasma. Alternatively, inhibition can be expressed as "hirudin equivalent".

#### Low hirudin concentration range:

This protocol is proposed for testing hirudin (or DTI) in citrated plasma, and is used for hirudin concentrations of about 1 µg/mL. It must be adapted to the thrombin inhibitor used.

**Calibration curve:** The Plasma Hirudin Standard kit, low range (# ASC020K), can be used for preparing the calibration curve. If a homemade calibration is used, prepare 1 mL of normal citrated plasma (or a normal plasma pool) containing 2 µg/mL of hirudin, using preferably the hirudin used for patient's treatment. Using this preparation, or with the calibration kit, the calibration curve is obtained as follows:

Hirudin	µg/mL	0	0.5	1	1.5	2
Normal plasma with 2 µg/mL hirudin (µL)		0	25	50	75	100
Normal plasma (µL)		100	75	50	25	0
R3 buffer (µL)		900	900	900	900	900

The calibration plasmas, already diluted 1:10, are obtained.

#### High hirudin concentration range:

This protocol is used for hirudin concentrations in plasma of about 3 to 4 µg/mL.

**Calibration curve:** The Plasma Hirudin Standard kit, high range (# ASC020L), can be used for preparing the calibration curve. If a homemade calibration is used, prepare 1 mL of normal citrated plasma (or a normal plasma pool) containing 5 µg/mL of hirudin, using preferably the hirudin used for patient's treatment. Using this preparation or the calibration kit, the calibration curve is obtained as follows:

Hirudin	µg/mL	0	1.25	2.50	3.75	5
Normal plasma with 5 µg/mL hirudin (µL)		0	25	50	75	100
Normal plasma (µL)		100	75	50	25	0
R3 buffer (µL)		2400	2400	2400	2400	2400

The calibration plasmas, already diluted 1:25, are obtained.

In order to get the full assay performances, the calibration curve must be run within two hours.

#### TESTED SAMPLES AND CONTROLS:

According to the protocol used, samples and controls are assayed at the 1:10 dilution (low range protocol, for expected concentrations ranging from 0 to 2µg/ml), or at the 1:25 dilution (high range protocol, for expected concentrations ranging from 0 to 5µg/ml) in R3 Buffer. The diluted samples must be tested within 2 hours.

#### ASSAY PROTOCOL:

##### Manual Method:

Into the microwell or the plastic test tube, incubated at 37°C, introduce:

Reagents	Microplate	Test Tube
Calibrators, or diluted tested plasmas, or Controls	50µl	200µl
Incubate for 1 min at 37°C, then introduce:		
R1 : Substrate	50µl	200µl
Mix and incubate for 1 min at 37°C, then introduce:		
R2 : Thrombin, preincubated at 37°C	50µl	200µl
Mix and incubate for 2 min at 37°C, exactly :		
Stop the reaction by introducing:		
Citric Acid (20g/L), or 20 % Acetic Acid	100µl	400µl
Mix and measure the Absorbance at 405nm against the sample blank.		

The yellow colour obtained is stable for 2 hours.

The sample blank is obtained by mixing the reagents in the reverse order from that of the test i.e.: Citric Acid (20 g/L), thrombin, substrate, diluted plasma.

Measure the Absorbance at 405 nm (A405). Subtract the sample blank from the A405 obtained for the assay.

##### Kinetics mode:

The assay can be read using a kinetics mode. In this case the change in absorbance is recorded from 10 to 100 seconds following the addition of substrate. There is then no need to subtract the sample blank, or to stop the reaction. The results are obtained using the change in absorbance (ΔA405) for calibrators and tested specimen.

##### Automated methods:

Adaptations to the various analysers are available upon request. The assay is then performed kinetically. The reaction does not require to be stopped and sample blanks are automatically subtracted. Reconstitution volumes can vary according to the automate used. Refer to each specific adaptation and specific cautions for each instrument.

#### Note:

- If higher or lower reactive volumes than those indicated here above are required for the method used, the same respective proportions between reagent concentrations and volumes used, must be adhered to, in order to maintain the assay performances.
- Run a sample blank in presence of highly lipemic, icteric or haemolysed plasmas, or if the plasmas has a "colour" different from the usual one.

#### QUALITY CONTROL:

Using commercially available quality control plasmas, titrated for the assayed DTI, allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity from run to run, when using a same lot of reagents. The calibration curve is acceptable when the concentrations measured for controls are within the acceptance range. Various control plasmas are available: Plasma Hirudin Control (# ASC025K). Each laboratory should verify its own target values and acceptance ranges, for each assayed DTI, in the exact working conditions, for each new lot of controls.

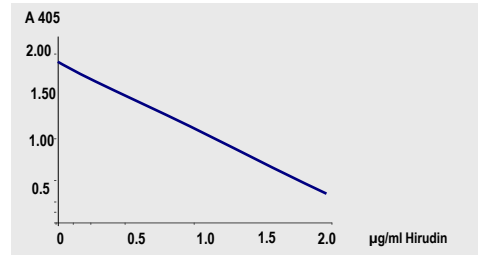
**Note:** A new calibration curve must be carried out for each new lot of reagents, after each important maintenance of the analyzer, or when measured values for the quality controls are out of the acceptance range determined for the method. Each laboratory can establish its own acceptance ranges, according to the instruments and protocols used.

#### RESULTS:

- For the end-point method, use a linear graph paper and plot on abscissa the hirudin (or DTI) concentration (µg/ml) and on ordinates the corresponding absorbances (A405). An inverse linear relationship is obtained between hirudin (or DTI) concentrations and measured A405 : the calibration curve is valid if  $r^2 \geq 0.98$ , and if measured values for controls are in compliance for the method.
- The hirudin (or DTI) concentration in the tested sample (diluted 1:10 for the low range or 1:25 for the high range protocol) is directly obtained on the calibration curve. Results are expressed as µg/ml of hirudin (or DTI).
- When the kinetics mode is used, proceed the same way by plotting the ΔA405 values obtained, instead of A405.
- Using automated methods, the concentrations are directly calculated by the analyser, respectively to the calibration curve, and the sample dilution used.
- When the assay dilution is 1:10 (low range) or 1:25 (high range), the hirudin (or DTI) concentration is directly read on the calibration curve.

#### EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curve below is an example only, using the manual method. Only the calibration curve generated for the series of assays performed must be used for calculating the hirudin concentrations.



#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

- The dynamic range is from 0 to 2µg/ml (low range) or 0 to 5µg/ml (high range) hirudin.
- The detection threshold for the assay is evaluated on the calibration curve by measuring the "apparent" hirudin concentration, which corresponds to the mean A405 value obtained for a sample free of hirudin (normal plasma) less 3 Standard Deviations (SD). This detection threshold is of about 0.15 µg/ml for the low range, and 0.30 µg/ml for the high range.
- Biophen DTI reagent contains an heparin neutralizing substance : the assay can be run on heparinized samples (no significant interference is observed up to 2 IU/ml UFH or LMWH in plasma).
- For an optimal therapeutic efficacy, the measured DTI concentration must be within the therapeutic range defined by the manufacturer for the corresponding indication.
- The assay is calibrated and optimised for hirudin concentration, expressed in µg/mL. The specific activity for hirudin drugs can vary from product to product or from lot to lot (from < 10,000 ATU/mg to > 15,000 ATU/mg). The curves are constructed respectively to the hirudin concentration. If a calibration by hirudin activity, expressed in ATU\*µL, is needed, or when a different thrombin inhibitor is used, the user must take into account the specific anti-thrombin activity of the preparation used. (\*ATU: Anti-Thrombin Unit).
- The influence of progressive thrombin inhibitors can be neglected because of the short incubation time.
- Example of reproducibility results obtained using the STAR instrument:

	µg/ml hirudin	Intra Assay CV% -N=10	Inter Assay CV% (N=4)
Sample 1	1.1	4.8%	<5%
Sample 2	2.1	1.5%	<5%

- **Correlations:** The Biophen DTI assay shows good correlation with Hemoclot Thrombin Inhibitors kit (CK002K), for hirudin assay, performed on STAR instrument.
- **Limitations of the procedure:**
  - Avoid blood activation, during specimen collection and plasma preparation.
  - Any other anti-thrombin substance (than heparin) in the tested specimen is susceptible to affect the results.
  - In order to get the optimal assay performances, the working instructions must be carefully observed.
  - In our experience, this assay is not appropriate for measuring Argatroban® concentrations in plasma. This DTI exhibits a strong anti-thrombin anticoagulant activity, but it has only a weak inhibition for chromogenic thrombin activity, at the therapeutical doses used.

#### REFERENCES:

1. Greinacher A, Warkentin T, The direct thrombin inhibitor hirudin, *Thromb Haemost*; 99: 819-829; 2008
2. Schramm et al, Development of a chromogenic substrate for the determination of hirudin in plasma, *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2(1):121-7, 1991.

# BIOPHEN DTI

## Ref A220202

### Dosage des inhibiteurs directs de la thrombine par méthode chromogène

Recherche in vitro exclusivement (RUO)



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 29/08/2008

#### UTILISATION :

Le coffret Biophen DTI est une technique chromogène anti-IIa pour la mise en évidence et la détermination quantitative in vitro de l'activité de l'hirudine et autres inhibiteurs directs de la thrombine (DTIs), sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée.

#### INTERET CLINIQUE :

Indications préventives ou curatives des inhibiteurs directs de la thrombine, et en particulier l'hirudine : leur mesure dans un plasma humain est utilisée comme aide pour le suivi et l'adaptation du traitement.

#### PRINCIPE :

La méthode Biophen DTI est un dosage basé sur l'inhibition d'une quantité constante et en excès de Thrombine (FIIa), par l'hirudine ou le DTI à doser, puis l'hydrolyse d'un substrat chromogène spécifique de la Thrombine, par la Thrombine résiduelle, qui clive le pNA de ce substrat. La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est fonction de la quantité de Thrombine résiduelle. Elle est inversement proportionnelle à la concentration d'hirudine ou DTI présent dans le milieu réactionnel.

[DTI] + [FIIa (excès)] → [FIIa-DTI] + [FIIa résiduel]  
[FIIa (résiduel)] + Substrate → Peptide + pNA

#### ECHANTILLONS :

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté où la présence d'hirudine (ou autre inhibiteur direct de la thrombine) est recherchée.

#### REACTIFS :

##### R1 : Réactif 1 : Substrat de la thrombine

Substrat chromogène (CS-01(81)), spécifique de la thrombine, lyophilisé en présence de stabilisants, d'un agent neutralisant de l'héparine, et d'un agent inhibiteur de la polymérisation de la fibrine. 2 flacons (à reconstituer par 2.5 ml d'eau distillée).

##### R2 : Réactif 2 : Thrombine

Thrombine humaine purifiée, lyophilisée en présence de stabilisants. 2 flacons (à reconstituer par 2.5 ml d'eau distillée).

##### R3 : Réactif 3 : Tampon Tris BSA

Tampon réactionnel Tris NaCl, pH 8.40, contenant 1% de BSA et de l'azide de sodium comme conservateur. Prêt à l'emploi. 2 flacons d'environ 25 ml.

#### Précautions :

- Le plasma humain utilisé pour la préparation de la thrombine, a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VCH. Le plasma bovin, utilisé pour la préparation de la BSA, a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.
- Le tampon R3 contient de faibles quantités d'azide de sodium (0.9 g/l de NaN3), qui peuvent générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.
- L'optimisation du dosage a été réalisée de façon à minimiser toute interférence en cas de traitement par l'héparine.
- La concentration de thrombine est ajustée pour chaque lot afin d'obtenir la réactivité optimale dans le dosage.

#### REACTIFS ET MATERIELS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

##### Réactifs :

- Eau distillée, stérile de préférence.
- Acide acétique (20%) ou acide citrique 2% (méthode en point final).
- Plasmas de calibration titrés en hirudine (ex : Plasma Hirudin Standard Low (réf ASC020K) ou High (réf ASC020L) Ou Matériel de référence pour dosage de l'inhibiteur direct de la thrombine à tester (international ou interne, préparation pharmaceutique...)).
- Plasmas contrôlés titrés en hirudine (ex : Plasma Hirudin Control (réf ASC025K) ou en inhibiteur direct de la thrombine à tester.

##### Matériels :

- Spectrophotomètre ou automates pour dosages chromogéniques, à 405 nm.
- Chronomètre.
- Pipettes calibrées.

#### STANDARDISATION :

Référence Interne pour Hirudine, ou préparations pharmaceutiques ou référentiels de la Pharmacopée, dilués en plasma.

#### CONSERVATION :

Les réactifs non encore utilisés doivent être conservés à 2-8 °C, dans leur coffret d'origine. Ils sont alors stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

**Nota :** Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

#### PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

**Nota :** Le volume de reconstitution des réactifs est susceptible de varier suivant l'instrument utilisé. Se reporter à l'adaptation spécifique pour chaque automate.

##### R1 : Réactif 1 : Substrat chromogène spécifique de la thrombine :

- Reconstituer chaque flacon par exactement 2.5 ml d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) jusqu'à dissolution complète.
- Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.
- Bien homogénéiser avant toute utilisation.

Stabilité du réactif R1 reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 72 heures à 2-8°C.
- 24 heures à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois à -20°C ou moins.

##### R2 : Réactif 2 : Thrombine humaine

- Reconstituer chaque flacon par exactement 2.5 ml d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) jusqu'à dissolution complète.
- Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.
- Bien homogénéiser avant toute utilisation.

Stabilité du réactif R2 reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 72 heures à 2-8°C.
- 24 heures à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois à -20°C ou moins.

##### R3 : Réactif 3 : Tampon Tris BSA.

Tampon prêt à l'emploi (25 ml par flacon). Agiter avant emploi.

Ce réactif est stable jusqu'à la date de péremption, conservé à 2-8°C, à l'abri de toute contamination.

#### Précautions :

- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage, avec leurs bouchons respectifs (capsules jaunes pour R1, blanches pour R2, et bouchon blanc pour le tampon R3).
- Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination.
- Si le substrat jaunit, ceci indique la présence d'une contamination. Il doit être rejeté et un nouveau flacon doit être utilisé.

#### Nota :

- Les flacons R1 et R2 sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.
- Suivant la méthode automatique utilisée, les réactifs peuvent être reconstitués avec des volumes différents de ceux indiqués. Dans tous les cas, les rapports respectifs de chaque réactif, R1 et R2, préconisés dans la méthode manuelle (concentration finale dans le milieu réactionnel et volume total), doivent être respectés.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffrets. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage. Les réactifs R1 et R2 sont optimisés pour chaque lot de coffrets.

#### COLLECTE, PREPARATION ET STOCKAGE DES ECHANTILLONS TESTES :

Le sang (9 vol.) doit être prélevé sur du citrate trisodique 0.109M (ou 0.129M) (1 vol.); le plasma est obtenu par décantation du surnageant après 20 min. de centrifugation à 2,500 g. Le plasma citraté doit être utilisé : dans les 4 heures s'il est maintenu à température du laboratoire (18-25°C), ou il peut-être conservé congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 1 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C.

**Note :** se référer aux recommandations du GEHT ou du CLSI pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons. Rejeter tout prélèvement suspect.

#### PROCEDURE :

Le coffret Biophen DTI est utilisé en méthode cinétique, automatisée, et peut être également utilisé en méthode manuelle, en «point final». Les adaptations sur automates sont disponibles sur demande. Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405nm.

D.750.01/BI/0202



8580 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

## ETALONNAGE :

Selon la posologie d'hirudine (ou autre DTI) utilisée, le dosage est effectué à l'aide d'une des variantes décrites ci-dessous.

**Nota:** Les coffrets d'étalonnage "gamme basse" ou "gamme haute" pour l'hirudine (réf: ASC020K ou ASC020L) peuvent être utilisés pour le dosage « Biophen DTI » de l'hirudine. Lorsque d'autres inhibiteurs directs de la thrombine sont utilisés, la gamme d'étalonnage peut être préparée en diluant l'inhibiteur en plasma normal. Alternativement, l'inhibition peut être exprimée en « équivalent hirudine ».

### Gamme basse d'hirudine :

Ce protocole est proposé pour tester l'hirudine (ou autre DTI) dans le plasma citraté, et utilisé pour des hirudinémies de l'ordre de 1 µg/ml. Il doit être adapté à l'inhibiteur de thrombine utilisé.

**Gamme d'Etalonnage:** Le coffret Plasma Hirudin Standard, gamme basse (réf. ASC020K) peut être utilisé pour préparer la gamme d'étalonnage. Alternativement, préparer un plasma normal citraté (ou un pool de plasma normal) contenant 2 µg/ml d'hirudine (de préférence celle utilisée pour le traitement). La gamme d'étalonnage est préparée de la façon suivante :

Hirudine	µg/ml	0	0,5	1	1,5	2
Plasma normal à 2 µg/ml d'hirudine (µl)		0	25	50	75	100
Plasma normal (µl)		100	75	50	25	0
Tampon R3		900	900	900	900	900

Les points d'étalonnage sont ainsi déjà dilués au 1/10.

### Gamme haute d'hirudine :

Utilisée pour des hirudinémies de l'ordre de 3 à 4 µg/ml de plasma. A adapter à l'inhibiteur de thrombine utilisé.

**Gamme d'Etalonnage:** Le coffret Plasma Hirudin Standard, gamme haute (réf. ASC020L) peut être utilisé pour préparer la gamme d'étalonnage. Alternativement, préparer 1 ml de plasma normal citraté (ou un pool de plasma normal) contenant 5 µg/ml d'hirudine (de préférence celle utilisée pour le traitement). La gamme d'étalonnage est préparée de la façon suivante :

Hirudine	µg/ml	0	1,25	2,50	3,75	5
Plasma normal à 5 µg/ml d'hirudine (µl)		0	25	50	75	100
Plasma normal (µl)		100	75	50	25	0
Tampon R3		2400	2400	2400	2400	2400

Les points d'étalonnage sont ainsi déjà dilués au 1/25.

Réaliser la gamme d'étalonnage et la tester dans les 2 heures suivantes.

## ECHANTILLONS ET CONTROLES :

Suivant la variante utilisée, diluer les échantillons et contrôles au 1/10 (test en gamme basse de 0 à 2 µg/ml) ou au 1/25 (test en gamme haute de 0 à 5 µg/ml), en tampon Tris BSA (R3) pour le test. Les dilutions doivent être testées dans les 2 heures.

## MODE OPERATOIRE :

### • Méthode manuelle :

Dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C, introduire:

Réactifs	Microplaque	Tube plastique
Calibrateur, ou plasmas dilués à tester, ou contrôles	50µl	200µl
Incuber 1 minute à 37°C, puis introduire :		
R1 : Substrat	50µl	200µl
Mélanger et incuber 1 minute à 37°C, puis introduire :		
R2 : Thrombine, préincubée à 37°C	50µl	200µl
Mélanger et incuber à 37°C, pendant 2 minutes exactement :		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (20g/L) ou 20% d'acide acétique	100µl	400µl
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

La couleur jaune obtenue est stable pendant au moins 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui de la test : Acide Citrique (20g/L), thrombine, substrat, échantillon dilué.

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance obtenue pour le test.

### • Méthode cinétique :

Le dosage peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorption entre 10 et 100 secondes après l'addition du substrat (soit ΔA405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

### • Méthode automatisée :

Les adaptations sur les divers automates présents sur le marché sont disponibles sur demande. Le test est alors réalisé en méthode cinétique. Il n'est pas nécessaire d'arrêter la réaction, et les « blancs échantillons » sont soustraits automatiquement. Les volumes de reconstitution sont susceptibles de varier en fonction de l'instrument utilisé. Se reporter à l'adaptation spécifique et aux précautions indiquées pour chaque automate.

**Nota:** - Suivant les méthodes, si des volumes plus ou moins importants doivent être utilisés, respecter très exactement le rapport des volumes et des concentrations des différents réactifs constituant le milieu réactionnel.  
- Faire un blanc plasma si le plasma est citrique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

## CONTROLE DE QUALITE :

L'utilisation de plasmas de contrôle, titrés en inhibiteur testé, permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs. La courbe d'étalonnage est valide lorsque les concentrations obtenues pour les contrôles entrent dans la zone d'acceptation. Différents plasmas de contrôle sont disponibles : Plasma Hirudin Control (réf ASC025K). La valeur cible et le domaine d'acceptation devront être vérifiés pour chaque molécule dans les conditions de travail exactes du laboratoire pour chaque lot.

### Note :

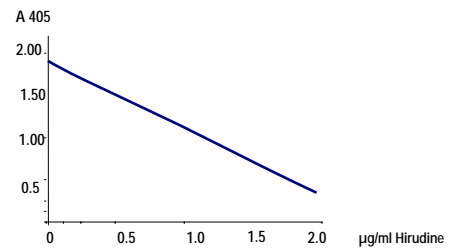
- Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée à chaque changement de lot de réactif, après toute maintenance importante de l'analyseur, et lorsque les résultats des contrôles de qualité ne sont pas dans les valeurs annoncées pour la méthode.
- Chaque laboratoire peut établir son propre domaine d'acceptation, en fonction des protocoles et des instruments utilisés.

## RESULTATS :

- Pour la méthode en point final, tracer la droite étalon en coordonnées linéaires en portant en ordonnées la DO à 405nm, et en abscisses le taux d'hirudine (µg/ml), ou de DTI utilisé. Une relation linéaire inverse est obtenue entre les concentrations d'hirudine (ou DTI) et les valeurs d'absorbance (DO405nm) obtenues : la calibration est acceptable si  $r^2 \geq 0,98$ , et que les valeurs mesurées pour les contrôles sont conformes pour la méthode.
- La concentration d'hirudine (ou DTI) dans l'échantillon à doser (dilué au 1/10 en gamme basse ou au 1/25 en gamme haute) est déduite directement de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en µg/ml d'hirudine.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, procéder de la même manière que ci-dessus, mais en utilisant les ΔA405 au lieu des A405.
- En technique automatique, les taux sont directement calculés par l'instrument en fonction des valeurs de l'étalonnage.
- Si la dilution utilisée est 1/10 (gamme basse) ou 1/25 (gamme haute), la concentration d'hirudine (ou DTI) est obtenue directement sur la courbe.

## EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage ci-dessous est donnée à titre d'exemple uniquement, au bain-marie. N'utiliser que la courbe générée pour la série de dosages réalisés.



## PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES :

- Zone de mesure : 0 à 2 µg/ml (gamme basse) ou 0 à 5 µg/ml (gamme haute) hirudine.
- La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le « taux apparent » d'hirudine, correspondant à la DO moyenne obtenue pour un taux réactionnel sans hirudine (plasma normal) moins 3 écart-types. Cette limite de détection est d'environ 0.15 µg/ml en gamme basse, et 0.30 µg/ml en gamme haute.
- Le réactif Biophen DTI contient un agent inhibiteur de l'héparine ; le dosage peut ainsi être réalisé sur plasmas de patients héparinés (aucune interférence significative n'a été observée jusqu'à 2 UI/ml en HNF ou HBPM dans le plasma).
- Pour une efficacité optimale des traitements, le taux mesuré pour le DTI doit se situer dans la zone thérapeutique définie par le fabricant pour l'indication concernée.
- Le test est optimisé et calibré par rapport à la concentration en hirudine. L'activité spécifique de l'hirudine peut varier selon la préparation et le lot (de <10000 UAT\*/mg à >15000 UAT\*/mg). Les courbes d'étalonnage sont établies en fonction du taux pondéral d'hirudine, exprimé en µg/ml. Si une calibration en activité hirudine (UAT\*/ml) est souhaitée, ou lorsqu'un autre inhibiteur direct de la thrombine est utilisé, l'utilisateur devra tenir compte de l'activité anti-thrombine spécifique de la substance utilisée. (\*UAT : Unité anti-thrombine).
- L'influence des inhibiteurs progressifs de la thrombine peut être négligée en raison des temps d'incubation courts.
- Exemple de valeurs de reproductibilité obtenues sur STAR :

	µg/ml hirudine	CV intra essai (N=10)	CV inter essais (N=4)
Echantillon 1	1.1	4.8%	<5%
Echantillon 2	2.1	1.5%	<5%

- **Corrélations :** Les résultats obtenus pour le dosage de l'hirudine avec le coffret Biophen DTI présentent une bonne corrélation avec le coffret Hemoclot Thrombin Inhibitors (ACK002K).

### • Limites de la méthode :

Éviter toute activation du sang, durant le prélèvement et la préparation du plasma. Toute substance anti-thrombine présente dans l'échantillon, autre que l'héparine, est susceptible d'influencer le dosage.

Pour obtenir les performances optimales du coffret, suivre scrupuleusement les instructions techniques.

Dans notre expérience, le dosage chromogène n'est pas adapté à la mesure de l'activité anti-thrombine de l'Argatroban®. Ce DTI a une forte activité anticoagulante en inhibant la thrombine, mais l'activité chromogène de la thrombine n'est que faiblement inhibée.

## REFERENCES :

1. Greinacher A, Warkentin T, The direct thrombin inhibitor hirudin, *Thromb Haemost*; 99: 819-829; 2008.
2. Schramm et al, Development of a chromogenic substrate for the determination of hirudin in plasma, *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2(1):121-7, 1991.