

CE HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS

ACK002K

Clotting assay for the quantitative measurement of hirudin and other direct thrombin inhibitors in plasma

For in vitro diagnostic use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 17/12/2010

Intended use:

HEMOCLOT® THROMBIN INHIBITORS is an in-vitro diagnostic device intended to be used for the quantitative measurement of direct thrombin inhibitors (DTI), such as hirudin, Argatroban®, and dabigatran in human citrated plasma, with a clotting method based on the inhibition of a constant and defined concentration of thrombin. It is intended for prescription use. Measuring DTI concentrations in patient's plasma may be used as an aid in the management of patients receiving DTIs who are suspected of having excess anticoagulant activity.

Specimen:

Plasma prepared from citrated anticoagulated blood, where hirudin or any other DTI activity must be measured.

Assay principle:

For measuring hirudin or any other DTI in plasma, first, the diluted tested plasma is mixed with a normal pooled human plasma (R1). Clotting is then initiated by adding a constant amount of highly purified human thrombin, in the α form (R2). The clotting time measured is directly related to the concentration of hirudin or assayed DTI in the tested plasma.

Reagents:

Each kit contains:

- **R1 (Reagent 1)** : 3 vials of 1 mL of normal pooled citrated plasma, lyophilized.
- **R2 (Reagent 2)** : 3 vials of 1 mL of highly purified human calcium thrombin (in the α form), stabilised with additives, and lyophilised.

Warning: Thrombin (R2) is prepared by activation of purified prothrombin extracted from human plasma. Human plasmas used for the pool (R1) and thrombin preparation were tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. Bovine Serum Albumin (BSA) (R2) 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.

Reagents and material required, but not supplied

Reagents:

- Distilled water, preferentially sterile.
- Dilution buffer: 0.15M NaCl physiological saline solution, or Owren Koller type buffer (eg #AR003A/K). **The same diluent must be used for all the tests performed.**
- Normal plasma (or plasma pool) and reference material for Hirudin or other assayed DTI, or calibration and quality control plasmas titrated for the assayed DTI. The following references are available:

	Hirudin (Lepirudin/ Refludan®)	Argatroban®	Dabigatran
Calibrators	ASC020K (usual low range) or ASC020L (high range) (2 calibrators to prepare 5 levels, per kit)	ASC030K (5 levels, ready to use)	A222801 (3 levels, ready to use)
Controls	ASC025K	ASC035K	A224701

Material:

- Pipettes with dispensing volumes of 20 μ L, 50 μ L and 100 μ L.
- Pipette with a variable dispensing volume from 50 μ L to 1,000 μ L.
- Semi-automatic or automatic coagulation instrument, or fibrometer or electromagnetic water bath and stop watch.

Storage conditions

Reagents must be stored at 2-8°C, in their original packaging box. They are then stable, before any use, 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:

- **R1: Normal pooled plasma:**

Reconstitute each vial with **exactly 1 mL** of distilled water. Shake until complete dissolution of the content (vortex). Let to homogenize for 15 min. at room temperature (18-25°C) while shaking the vial from time to time.

Homogenize before each use. .

- **R2: Human calcium Thrombin:**

Reconstitute each vial with **exactly 1 mL** of distilled water. Shake until complete dissolution of the content (vortex). Let to homogenize for 15 min. at room temperature (18-25°C) while shaking the vial from time to time.

Homogenize before each use.

Stability of restored reagents, provided that any contamination or evaporation is avoided, kept in the original vial or in a plastic tube, is at least:

- **8 hours at room temperature (18-25°C).**
- **24 hours at 2-8°C.**
- **2 months frozen** in the original vial or in a plastic tube at -20°C or below (before use thaw in a water bath at 37°C for at least 15 min.).

Cautions:

- In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use. .
- Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination or evaporation during use.
- Reagents are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any loss of powder when opening the vials.
- Incubating the reconstituted vials at RT allows stabilizing the reagents, and obtaining a homogeneous reactivity.
- Take care to limit as much as possible any evaporation of the reagents during use, eg. by using chimneys.
- Use only reagents from kits with the same lot number.
- **Do not mix reagents from kits with different lots when running the assay. Reagents are optimized for each lot of kits.**

- Refer to each specific adaptation.

Sample collection and preparation:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M trisodium citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma must be tested within:

- 8 hours when stored at room temperature (18-25°C)
- 24 hours if kept at 2-8°C
- frozen at -20°C or below, for up to 6 months. Just before use, the plasma must be thawed for 15 min. in a water bath at 37°C. Thawed plasma must be used within 4 hours, at room temperature (18-25°C).

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

Tested plasma

Tested plasma must be used diluted in 0.15 M NaCl physiological saline solution or in Owren Koller buffer, according to the assay variant used:

Low range protocol (usual one) : 1:8 dilution
High Hirudin range protocol : 1:20 dilution

Procedure:

The assay is calibrated with the DTI used. The kit is currently validated for assaying Hirudin (Lepirudin/Refludan®), dabigatran, and Argatroban®.

The assay working ranges are:

Low range protocol (usual one) :

Hirudin (usual posology): 0 to 2 μ g/ml
Dabigatran: 0.05 to 0.5 μ g/ml
Argatroban®: 0 to 2 μ g/ml

High Hirudin range protocol :

Hirudin (elevated concentrations): 0 to 5 μ g/ml

The kit can also be used with other DTIs, but for current research use only, as associated commercial calibrators are still not available yet. When required, the protocol must be adjusted to the DTI used : a calibration curve can be prepared by spiking the assayed inhibitor into normal plasma. Alternatively, inhibition can be expressed as "hirudin equivalent".

D.750.02/CK/002K



8560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@anlara.com

www.anlara.com

1. Usual Low Range :

Calibration curve:

Prepare the calibration curve for the assayed DTI according to the specific instructions indicated on each calibrator insert (Hirudin low range #ASC020K, Argatroban® #ASC030K, or dabigatran #A222801). Consider the exact concentrations ("C") indicated for each lot on the flyer provided within the kit.

Alternatively, if a homemade calibration is used, prepare a normal citrated plasma (or plasma pool) containing 2 µg/mL of hirudin (using preferably the hirudin used for patient's treatment) or Argatroban®, or 0.50 µg/ml of dabigatran.

Then prepare the indicative following calibration curve in normal plasma, according to the DTI used:

µg/mL (Hir. or Argatroban®)	0	0.5 or C:4	1 or C:2	1.5 or 3C:4	2 or C
µg/mL (dabigatran)	0.05 or C:10	0.25 or C:2	0.50 or C		

These calibration plasmas must then be diluted 1:8 in the diluent, for the test (ie 100µl of point + 700µl of diluent). **OR Refer to each specific adaptation.**

In order to get the full assay performances, the calibration curve must be prepared just before running the assay.

Tested plasmas or controls:

Tested plasmas or controls must be diluted 1:8 in the diluent, for the test (ie 100µl of point + 700µl of diluent). The diluted samples must be tested within 1 hour.

2. High Range for hirudin :

Used for hirudin concentrations in plasma of about 2 to 4 µg/mL (eg: ECC).

Calibration curve:

Prepare the calibration curve according to the specific instructions indicated on the calibrator insert (Hirudin High range #ASC020L). Consider the exact concentrations ("C") indicated for each lot on the flyer provided within the kit.

Alternatively, if a homemade calibration is used, prepare a normal citrated plasma (or plasma pool) containing 5 µg/mL of hirudin (using preferably the hirudin used for patient's treatment).

Then prepare the indicative following calibration curve in normal plasma:

µg/mL (Hirudin)	0	1.25 or C:4	2.50 or C:2	3.75 or 3C:4	5 or C
-----------------	---	-------------	-------------	--------------	--------

These calibration plasmas must then be diluted 1:20 in the diluent, for the test (ie 100µl of point + 1900µl of diluent). **OR Refer to each specific adaptation.**

In order to get the full assay performances, the calibration curve must be prepared just before running the assay.

Tested plasma or controls:

Tested plasmas or controls must be diluted 1:20 in the diluent, for the test (ie 100µl of point + 1900µl of diluent). The diluted samples must be tested within 1 hour.

3. Assay protocol :

Note: Testing in duplicate is recommended for all calibrators, controls and samples.

Manual method:

Preincubate thrombin at 37°C.

In a test tube or in a cuvette at 37°C introduce:

- 100 µL of normal pooled plasma (R1)
- 50 µL of calibration solution or of tested plasma, diluted 1:8 (low range) or 1:20 (high range)

Incubate for 1 Min. at 37°C, then introduce:

- 100 µL of thrombin (R2), preincubated at 37°C, starting the stop watch.

Record the clotting time (in seconds).

Note: The assay is suitable for testing other DTIs, but for research purposes only. Users should prepare their own calibration curve according to the expected therapeutic levels, assay dynamic range for the DTI used, and adjust the working dilution when required.

Automated methods:

Adaptations to various analysers are available upon request. **Refer to each specific DTI, adaptation and specific cautions for each instrument.**

Quality control:

Using suitable 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 linearity ($r^2 \geq 0.98$) and the concentrations measured for controls are within the acceptance range. Various control plasmas are available:

Hirudin (Lepirudin)	ASC025K (C1 more representative for low range, and C2 for high range)
Argatroban®	ASC035K
Dabigatran	A224701

Each laboratory should verify (and adjust if required) its own target values and acceptance ranges, in the exact working conditions, for each new lot of reagents used.

Note: Include at least one quality control at each level in each series, as per good laboratory practice. A new calibration curve must be carried out preferentially for each test series, and at least 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 (after checking all other parameters of the system). Each laboratory should establish and verify its own target values, acceptance ranges and expected performances, according to the combination of assayed DTI, reagents lots, instruments and protocols used, and in its exact working conditions.

Expression of results

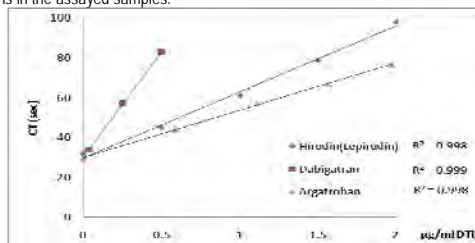
On a linear graph paper, plot on abscissae the assayed DTI concentrations (eg in µg/ml) and on ordinates the corresponding clotting times (CT in seconds). On the calibration curve obtained, interpolate directly the corresponding DTI concentration for the tested plasma (when the standard dilution is used for the assay).

Using automated methods, the DTI concentrations are directly calculated by the analyzer, respectively to the calibration curve, and the sample dilution used.

The measured DTI concentration must be analyzed considering the posology used and the clinical context for the patient. In case of unexpected result, the concentration must be verified by performing a new testing, and if required by using another method to evaluate the hypocoagulability state of the patient.

Example of calibration curve:

The calibration curve below is given as an example only, using the STAR (low range). Only the calibration curve generated for the series of assays performed must be used for calculating the concentrations in the assayed samples.



Performances and characteristics, Interferences:

- The HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS reagents do not contain heparin inhibitors. Presence of heparin or of other anti-thrombin substances, different from the one to be tested, may interfere in the assay and prolong the clotting time. Therefore, any anti-thrombin activity present in the tested plasma is not masked and this allows avoiding any underestimation of an existing hypocoagulability, as the result from the presence of an anti-thrombin substance.
- Normal plasmas (without treatment) do not contain Thrombin Inhibitors (≤ 0.05 to 0.10 µg/ml) using the low range protocol.
- Example of reproducibility data using STAR instrument (low range) and lyophilized calibrators:

Lyophilized sample	µg/ml	Intra Assay CV%	Inter Assay CV%
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)

Limitations of the procedure:

Blood activation, during specimen collection and plasma preparation, may interfere in the assay. Discard any sample presenting an unusual aspect (icteric, haemolysed, lipaemic...). No significant interference of excess or deficiency of other plasma factors was identified, in compliance with the test principle using diluted test plasma and a substrate plasma in excess. However special caution is recommended for plasmas presenting a constitutional or acquired hypocoagulability. In order to get the optimal assay performances, the working instructions must be carefully observed. Each laboratory should establish and verify its own working range, expected values and acceptance ranges, as well as performances, in the exact laboratory working conditions (combination of reagents lots and instrument used), and for its specific application.

Complementary Information :

The assay is 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/mL, 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

References:

- Gréinacher 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 Hemostasis, 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.

D.750.02/CK/002K

HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS

Référence ACK002K

Coffret pour dosage de l'Hirudine et autres inhibiteurs directs de la thrombine par méthode chromométrique « anti-thrombine »



Fabricant: HYPHEN BioMed

Usage diagnostique *in vitro* exclusivement

Dernière révision : 17/12/2010

Utilisation :

Coffret pour la mise en évidence et aide au dosage quantitatif de l'**hirudine** et autres Inhibiteurs Directs de la Thrombine (DTIs) (tels que **dabigatran** (lorsque cela est nécessaire, en cas de suspicion d'un excès d'activité anticoagulante), ou **Argatroban®**) dans le plasma, par méthode coagulante, par inhibition d'une quantité constante et définie de thrombine.

Echantillons :

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté où l'activité de l'hirudine ou autre DTI doit être mesurée.

Principe :

Pour doser la concentration d'hirudine ou DTI dans un plasma, dans un premier temps, l'échantillon à tester est ajouté à un pool de plasma humain normal (R1). La coagulation est ensuite initiée par ajout de thrombine humaine, très purifiée, essentiellement sous forme d' α -Thrombine (R2). Le temps de coagulation obtenu est fonction de la concentration d'hirudine ou DTI dosé dans le plasma à tester.

Réactifs :

Chaque coffret contient :

- **R1 (Réactif 1) :** 3 flacons de 1 ml de pool de plasma normal, lyophilisé.
- **R2 (Réactif 2) :** 3 flacons de 1 ml de thrombine calcique humaine, très pure, stabilisée en présence d'excipients favorisant la coagulation, lyophilisée.

Précautions : La thrombine (R2) est préparée par activation de prothrombine purifiée à partir de plasma humain. Les plasmas humains utilisés pour la préparation du pool (R1) et de la thrombine (R2) ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VCH. Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA (R2) 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.

Matériel et réactifs nécessaires et non fournis :

Réactifs :

- Eau distillée, préférentiellement stérile.
- Tampon de dilution : Solution saline physiologique à 0,15M de NaCl, ou tampon type Owren Koller (#AAR003A/K). **Utiliser le même diluant pour l'ensemble des tests réalisés.**
- Plasma ou pool de plasma normal et matériel de référence pour hirudine ou autre DTI à doser, ou coffrets d'étalonnage et plasmas de contrôle titrés dans le DTI à doser. Les références suivantes sont disponibles :

	Hirudine (Lepirudine/ Refludan®)	Argatroban®	Dabigatran
Calibrateurs	ASC020K (usuel gamme basse) ou ASC020L (gamme haute) (2 calibrants pour préparer 5 points, par kit)	ASC030K (5 niveaux, prêt à l'emploi)	A222801 (3 niveaux, prêt à l'emploi)
Contrôles	ASC025K	ASC035K	A224701

Matériel :

- Pipettes à volume fixe de 20 μ l, 50 μ l et de 100 μ l.
- Pipette à volume variable de 50 μ l à 1000 μ l
- Appareil de coagulation semi-automatique ou automatique, fibromètre ou Bain-Marie électromagnétique et chronomètre le cas échéant.

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.

Préparation et stabilité des réactifs :

- **R1 : Pool de plasma normal :**

Reconstituer chaque flacon par **exactement 1 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 au moins 15 minutes, en agitant de temps en temps. **Bien homogénéiser avant toute utilisation.**

- **R2 : Thrombine Calcique humaine :**

Reconstituer chaque flacon par **exactement 1 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 au moins 15 minutes, en agitant de temps en temps. **Bien homogénéiser avant toute utilisation.**

La stabilité des réactifs reconstitués, conservés dans leur flacon d'origine ou en tube plastique, et sous réserve de toute contamination ou évaporation, est d'au moins :

- **8 heures à température du laboratoire (18-25°C).**
- **24 heures à 2-8°C.**
- **2 mois congelés** dans le flacon d'origine ou en tube plastique à -20°C ou moins (avant utilisation, décongeler au moins 15 minutes au bain marie à 37°C).

Précautions :

- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage, avec leurs bouchons respectifs.
- Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination ou évaporation.
- Les flacons sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.
- La stabilisation des flacons à TA, après reconstitution, permet d'obtenir une réactivité homogène et stable dans le temps.
- Afin d'éviter l'évaporation des réactifs pendant leur utilisation, limiter au maximum la zone d'échange en utilisant, par exemple, des cheminées plastiques et/ou des capsules operculées.
- 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 sont optimisés pour chaque lot de coffrets**

Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109 M (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé :

- dans les 8 heures s'il est maintenu à température du laboratoire (18-25°C),
- dans les 24 heures s'il est à 2-8°C
- congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 6 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 4 heures à température du laboratoire (18-25°C).

Note : se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS/CLSI pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons. Rejeter tout prélèvement suspect (ictérique, hémolysé, lipémique...).

Plasma à tester

Le plasma à tester est utilisé dilué dans une solution physiologique saline à 0,15M ou dans un tampon Owren Koller suivant la variante utilisée :

Protocole gamme basse (usuel) : dilution au 1/8

Protocole gamme haute d'Hirudine : dilution au 1/20

Protocole opératoire

Le dosage est calibré avec le DTI à doser. A ce jour, ce coffret est validé pour le dosage de l'Hirudine (Lépirudine / Refludan®), le dabigatran et l'Argatroban®.

Les zones de mesure sont :

Protocole gamme basse :

Hirudine (posologie usuelle) : 0 à 2 μ g/ml
Dabigatran : 0.05 à 0.50 μ g/ml
Argatroban® : 0 à 2 μ g/ml

Protocole gamme haute :

Hirudine (fortes concentrations) : 0 à 5 μ g/ml

Le coffret est également utilisable avec les autres DTIs, mais à usage de recherche au stade actuel, car les calibrants ne sont pas encore disponibles commercialement. Le protocole doit être adapté le cas échéant au DTI utilisé : la gamme d'étalonnage peut être préparée en diluant l'inhibiteur à doser en plasma normal. Alternativement, l'inhibition peut être exprimée en « équivalent hirudine ».

D.750.01/CK/002K



8560 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

1. Gamme Basse (usuelle) :

Gamme d'étalonnage :

Préparer la gamme d'étalonnage pour le DTI à doser selon le mode opératoire indiqué sur les coffrets de calibration spécifiques (**Hirudine gamme basse #ASC020K, Argatroban® #ASC030K, ou dabigatran #A222801**). Considérer les concentrations exactes (« C ») indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.

Alternativement, préparer un plasma (ou pool) normal citraté contenant **2 µg/ml hirudine** (de préférence celle utilisée pour le traitement) ou **Argatroban®**, ou **0.50 µg/ml de dabigatran**.

Préparer alors la gamme d'étalonnage indicative suivante en plasma selon le DTI :

µg/ml (Hir. ou Argatroban®)	0	0,5 ou C/4	1 ou C/2	1,5 ou 3C/4	2 ou C
-----------------------------	---	------------	----------	-------------	--------

µg/ml (dabigatran)	0,05 ou C/10	0,25 ou C/2	0,50 ou C
--------------------	--------------	-------------	-----------

Diluer ensuite ces calibrants au **1/8** en tampon pour le test (soit 100 µl de point et 700 µl de diluant). **OU se référer à l'adaptation spécifique.**

Pour une performance optimale, réaliser la gamme d'étalonnage extemporanément.

Plasmas à tester et contrôles :

Diluer le plasma à tester ou les contrôles au **1/8** en tampon (soit 100 µl d'échantillon et 700 µl de diluant). Les dilutions doivent être testées dans l'heure.

2. Gamme Haute d'hirudine:

Utilisée pour des hirudinémies de l'ordre de 2 à 4 µg/ml de plasma (ex : CEC).

Gamme d'étalonnage :

Préparer la gamme d'étalonnage selon le mode opératoire indiqué sur les coffrets de calibration spécifiques (**Hirudine gamme haute #ASC020L**). Considérer les concentrations exactes (« C ») indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni dans le coffret.

Alternativement, préparer un plasma (ou pool) normal citraté contenant **5 µg/ml hirudine** (de préférence celle utilisée pour le traitement).

Préparer alors la gamme d'étalonnage indicative suivante en plasma :

µg/ml (Hirudine)	0	1,25 ou C/4	2,50 ou C/2	3,75 ou 3C/4	5,0 ou C
------------------	---	-------------	-------------	--------------	----------

Diluer ensuite ces calibrants au **1/20** en tampon pour le test (soit 100 µl de point et 1900 µl de diluant). **OU se référer à l'adaptation spécifique.**

Pour une performance optimale, réaliser la gamme d'étalonnage extemporanément.

Plasmas à tester et contrôles :

Diluer le plasma à tester ou les contrôles au **1/20** en tampon (soit 100 µl d'échantillon et 1900 µl de diluant). Les dilutions doivent être testées dans l'heure.

3. Protocole de test :

Tester en duplicate est recommandé pour les calibrateurs, contrôles et échantillons.

• Méthode manuelle :

Préincuber la thrombine à 37°C.

Dans une cupule réactionnelle ou un tube à 37°C, introduire :

- **100 µl** de pool de plasma normal (R1)
- **50 µl** de point d'étalonnage ou plasma à tester, dilué au **1/8 (gamme basse)** ou **1/20 (gamme haute)**.

Incuber **1 min.** à 37°C, puis ajouter :

- **100 µl** de thrombine (R2) préalablement incubée à 37°C, en déclenchant le chronomètre.

Noter le temps de coagulation (en secondes).

Note : Le dosage convient pour d'autres DTIs, mais à des fins de recherche uniquement. Les utilisateurs devront préparer leur propre gamme en fonction des zones thérapeutiques attendues, de la zone de mesure du coffret pour le DTI utilisé, et ajuster la dilution utilisée le cas échéant.

• Méthode automatisée :

Les adaptations sur divers automates présents sur le marché sont disponibles sur demande. **Se reporter pour chaque DTI à l'adaptation spécifique et aux précautions indiquées pour chaque automate.**

Contrôle de qualité :

L'utilisation de plasmas de contrôle adaptés, titrés en DTI à doser, 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 la linéarité ($r^2 \geq 0,98$) et les concentrations obtenues pour les contrôles entrent dans la zone d'acceptation. Différents plasmas de contrôle sont disponibles :

Hirudine (Lepirudine)	ASC025K (C1 plus représentatif en gamme basse, et C2 en gamme haute)
Argatroban®	ASC035K
Dabigatran	A224701

La valeur cible et le domaine d'acceptation devront être vérifiés (et ajustés si nécessaire) dans les conditions de travail exactes du laboratoire pour chaque nouveau lot de réactifs.

Note : Inclure au moins un contrôle de qualité à chaque niveau dans chaque série, en accord avec les bonnes pratiques de laboratoire. Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée préférentiellement à chaque série de test, ou au moins 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 (après vérification des autres paramètres du système). Chaque laboratoire doit établir et valider ses propres valeurs cibles, domaines d'acceptation et performances attendues, en fonction de la combinaison de DTI, lots de réactifs, instruments et protocoles utilisés, et dans ses conditions de travail exactes.

Expression des résultats :

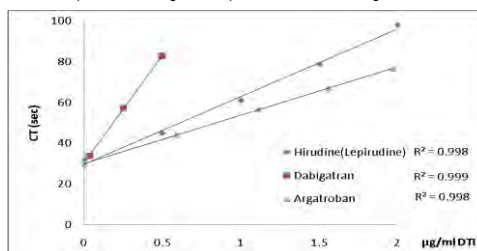
Sur papier millimétré, tracer la courbe d'étalonnage, en portant en abscisses les concentrations du DTI à tester (par exemple en µg/ml), et en ordonnées les temps de coagulation correspondants obtenus (en secondes). En fonction du temps de coagulation du plasma à tester, en déduire directement le taux de DTI (lorsque la dilution standard est utilisée).

En technique automatique, les taux de DTI des échantillons sont directement calculés par l'instrument, en fonction des valeurs de l'étalonnage, et de la dilution de travail utilisée.

La concentration du DTI mesuré doit être analysée par rapport à la posologie utilisée et au contexte clinique du patient. En cas de résultat inattendu, revérifier la concentration par un nouveau dosage, et si nécessaire utiliser une autre méthode pour évaluer le degré d'hypocoagulabilité du patient.

Exemple de courbe d'étalonnage :

Les courbes d'étalonnage ci-dessous sont données à titre d'exemple uniquement, sur STAR (protocole gamme basse). N'utiliser que la courbe générée pour la série de dosages réalisés.



Performances et caractéristiques, Interférences :

- Le réactif HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS ne contient pas d'inhibiteurs de l'héparine. La présence d'héparine ou d'inhibiteurs de la thrombine, autres que celui à tester, dans le plasma testé peut induire un allongement du temps de coagulation. Toute activité anti-thrombine n'est ainsi pas masquée, ce qui permet de ne pas sous-estimer la présence d'une hypo-coagulabilité.
- Les plasmas normaux (absence de traitement) ne contiennent pas d'inhibiteurs de la thrombine ($\leq 0,05$ à $0,10$ µg/ml) en protocole gamme basse.
- Exemple de valeurs de reproductibilité obtenues sur STA-R (gamme basse), par rapport à des calibrateurs lyophilisés :

Echantillon lyophilisé	µg/ml	CV intra essai %	CV inter essais %
Hirudine	1,15	2,8% (N=10)	5,0% (N=6)
Dabigatran	0,12	2,2% (N=20)	5,3% (N=20)
Argatroban®	1,25	2,3% (N=10)	2,2% (N=5)

Limites de la méthode :

L'activation du sang, durant le prélèvement et la préparation du plasma, peut être source d'interférence dans le dosage. Rejeter tout prélèvement suspect (ictérique, hémolysé, lipémique...). Aucune interférence significative (déficit ou excès des autres facteurs de la coagulation) n'a été identifiée, ce qui est conforme au principe du test utilisant le plasma à tester dilué et un plasma substrat en excès. Toutefois une vigilance particulière est recommandée en présence de plasmas présentant une hypocoagulabilité constitutionnelle ou acquise. Pour obtenir les performances optimales du coffret, suivre scrupuleusement les instructions techniques. Chaque laboratoire doit établir et vérifier ses propres zones de travail, valeurs attendues et intervalles d'acceptation, dans les conditions exactes de travail (combinaison de DTI dosé, lots de réactifs et instruments utilisés) et pour son application spécifique.

Informations complémentaires.

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 < 10,000 UAT*/mg à >15,000 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 DTI est utilisé, l'utilisateur devra tenir compte de l'activité anti-thrombine spécifique de la substance utilisée.

*UAT : Unité anti-thrombine

References:

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



BIOPHEN HEPARIN 3

Ref. A221003

Determinación de heparina y de anticoagulantes de tipo heparínico mediante un método cromogénico anti-Xa

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.



Fabricado por: HYPHEN BioMed

Última revisión: 21/09/2009

USO PREVISTO:

El kit Biophen Heparin 3 es un ensayo cromogénico para la determinación de la concentración de heparina y de anticoagulantes de tipo heparínico en plasma humano citratado mediante un método automático o manual.

FUNDAMENTOS CLÍNICOS:

En la actualidad, la heparina y los anticoagulantes de tipo heparínico se utilizan con fines curativos o preventivos. La determinación de la concentración de heparina en plasma de pacientes permite supervisar el tratamiento y ajustar la dosis del fármaco.

PRINCIPIO DEL ENSAYO:

BIOPHEN Heparin 3 es un método cromogénico anti-Xa desarrollado para determinar la heparina no fraccionada (HNF) y la heparina de bajo peso molecular (HBPM) de forma homogénea, utilizando la misma curva de calibración.

La heparina es un polisacárido sulfatado con una gran afinidad por la antitrombina. En combinación con la heparina, la antitrombina muestra una actividad inhibitoria rápida y potente de las serina esterases que intervienen en la coagulación: IXa, Xa y trombina. La HBPM y los análogos de la heparina, como el danaparoides sódico, son más eficaces que la trombina en la inhibición del factor Xa. Así pues, los ensayos anti-Xa son los métodos de elección para la determinación de heparinas y sus análogos.

BIOPHEN Heparin 3 es un método cinético basado en la inhibición de una cantidad constante de factor Xa, por parte de la heparina ensayada en presencia de antitrombina endógena, y la hidrólisis de un sustrato cromogénico específico de factor Xa (Sxa-11), debido al exceso de factor Xa. Esto provoca la liberación de pNA del sustrato. Así, la cantidad de pNA liberada depende de la actividad residual del factor Xa. Existe una relación inversa entre la concentración de heparina y la producción de color, determinada a 405 nm.

Heparina + AT → [AT hep.]

[AT hep.] + [FXa (exceso)] → [FXa-AT-hep.] + [FXa residual]

[FXa (residual)] + Sxa-11 → Péptido + pNA

REACTIVOS SUMINISTRADOS:

El kit BIOPHEN Heparin 3 contiene 3 viales de un sustrato de factor Xa específico y 3 viales de factor Xa bovino:

R1: Reactivo 1:

Sustrato cromogénico específico para factor Xa (Sxa-11), liofilizado en presencia de manitol:

3 viales de 7,5 mg (para reconstitución con 3 ml de agua destilada).

R2: Reactivo 2:

Factor Xa bovino, liofilizado:

3 viales de aproximadamente 7,5 µg (para reconstitución con 3 ml de agua destilada).

Nota:

- Este ensayo ha sido diseñado para minimizar la interferencia de sustancias antiheparínicas en el plasma, y en especial la de PF4.
- El factor Xa bovino se ha preparado a partir de plasma bovino, que ha sido analizado para confirmar la ausencia de agentes infecciosos, y se ha obtenido a partir de animales libres de EEB. Sin embargo, no existe ninguna prueba que pueda excluir por completo la presencia de agentes infecciosos. Como cualquier producto de origen bovino, este factor Xa debe utilizarse con todas las precauciones requeridas para la manipulación de material potencialmente infeccioso.
- La concentración de factor Xa bovino se ajusta para cada lote con el fin de proporcionar la reactividad correcta en el ensayo.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS:

Reactivos:

- Agua destilada.
- Ácido acético (20%) o ácido cítrico al 2% (método de punto final).
- Solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%).
- Calibradores de plasma con una concentración conocida de HNF, HBPM o danaparoides sódico, debidamente validados frente a un estándar internacional (NIBSC).
- Plasmas de control para HBPM, HNF o danaparoides sódico.

Materiales:

- Espectrofotómetro o instrumento automatizado para ensayos cromogénicos.
- Cronómetro; pipetas calibradas.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:

Los reactivos sin abrir deben almacenarse a 2-8 °C en el embalaje original para conservarse estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS:

Nota: los volúmenes de reconstitución pueden variar en función del método automatizado empleado. Consultar la adaptación a cada equipo específico.

REACTIVO 1: Sustrato Sxa-11 cromogénico específico de factor Xa

Reconstituir cada vial con exactamente 3 ml de agua destilada. Agitar bien (agitadora vorticial). Dejar homogeneizar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C), mientras se agita el vial de vez en cuando (agitadora vorticial), hasta la completa disolución del contenido. Comprobar que no queden residuos sólidos en el fondo del vial.

Nota: antes de cada uso, comprobar siempre que no haya residuos sólidos en el fondo del vial, lo que confirma que la disolución es completa. Si es necesario, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, o mejor a 37 °C, mientras se agita (agitadora vorticial) de vez en cuando. Si se requiere, incubar también durante la noche a temperatura ambiente.

Antes de cada uso, estabilizar a temperatura ambiente y homogeneizar el contenido (agitadora vorticial). Estabilidad del sustrato reconstituido, conservado en el vial original:

- 3 meses a 2-8 °C.
- 7 días a temperatura ambiente.
- No congelar.

REACTIVO 2: Factor Xa

Reconstituir cada vial con exactamente 3 ml de agua destilada. Agitar bien hasta la completa disolución del contenido (agitadora vorticial). Dejar homogeneizar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C), mientras se agita el vial de vez en cuando. Homogeneizar el contenido antes de cada uso. Estabilidad del factor Xa reconstituido, conservado en el vial original:

- 3 meses a 2-8 °C.
- 7 días a temperatura ambiente.
- No congelar.

Precauciones: para mejorar la estabilidad, los reactivos deben cerrarse después de cada uso con sus tapones de rosca originales (tapones de color blanco para factor Xa y de color amarillo para Sxa-11). Para evitar la contaminación durante el uso, los reactivos deben manipularse con cuidado. Si el sustrato se vuelve amarillo, es indicativo de presencia de un contaminante. Debe descartarse y utilizar un vial nuevo. La incubación de los viales reconstituidos permite estabilizar los reactivos y obtener una reactividad homogénea.

Nota:

- Los viales R1 y R2 están cerrados al vacío. Extraer el tapón con cuidado para evitar perder polvo al abrir los viales.
- En función del método automatizado empleado, los reactivos pueden reconstituirse con volúmenes diferentes a los recomendados. En cualquier caso, deben respetarse estrictamente las proporciones de reactivo establecidas (las concentraciones respectivas de reactivo en el medio reactivo) entre el factor Xa y su sustrato.
- Utilizar únicamente reactivos de kits con el mismo número de lote. No utilizar reactivos de kits de diferentes lotes para realizar el ensayo. Los reactivos R1 y R2 han sido optimizados para cada lote de kits.

PREPARACIÓN DE PLASMA:

La sangre debe recogerse en un recipiente con anticoagulante citrato 0,109 M (en proporción 9:1) con sumo cuidado para evitar la activación y la liberación de PF4. La obtención de muestras debe realizarse por medio de venopunción aséptica. Es preciso descartar las primeras gotas. Pueden utilizarse tubos para extracción de sangre específicos para el análisis de heparina, como por ejemplo, los tubos CTAD (citrato, teofilina, adenosina y dipiridamol). Todos ellos mejoran la estabilidad de la muestra.

- En el plazo de 1 hora, la sangre debe centrifugarse a 3.000 g durante 20 minutos a una temperatura de 18 °C o inferior, y el plasma debe decantarse en un tubo de plástico empleando una pipeta de plástico.
- Almacenamiento del plasma:
 - Hasta 2 horas a 20 °C.
 - Hasta 1 mes congelado a una temperatura de -20 °C o inferior (antes de usarlo, descongelar durante 15 minutos en un baño María a 37 °C).

Consultar el documento H21-A2 del NCCLS para obtener más información sobre la obtención, la manipulación y el almacenamiento de muestras.

D.750.21/BI/1003



8560 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

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO:

El kit Biophen Heparin 3 está específicamente diseñado para métodos cinéticos automatizados en instrumentos, y también puede utilizarse para métodos de punto final. Las adaptaciones para instrumentos automatizados están disponibles previa solicitud. El ensayo se lleva a cabo a **37 °C** y el color que aparece se determina a **405 nm**.

Con independencia del método utilizado, el ensayo debe realizarse conforme al esquema notificado para el método manual a fin de mantener una reactividad homogénea para HNF y HBPM.

Método manual:

En el micropocillo o tubo de ensayo incubado a **37 °C**, introducir:

	Micropocillo	Tubo de ensayo
Plasma no diluido	12 µl	30 µl
Agua destilada	36 µl	90 µl
R1: Sustrato SXa-11 Preincubado a 37 °C	80 µl	200 µl
Mezclar e incubar a 37 °C durante 2-5 minutos y luego añadir:		
R2: Factor Xa Preincubado a 37 °C	80 µl	200 µl
Mezclar e incubar a 37 °C durante exactamente:	90 s	120 s
A continuación, parar la reacción mediante la adición de:		
Ácido cítrico (20 g/l)	100 µl	500 µl
Mezclar y determinar la absorbancia a 405 nm frente al blanco correspondiente.		

El color amarillo es estable durante 2 horas.

El blanco de muestra se obtiene mezclando los reactivos en el orden inverso al del ensayo, es decir: ácido cítrico (20 g/l), sustrato SXa-11, plasma no diluido, agua destilada y factor Xa.

Determinar la absorbancia a **405 nm**. El valor del blanco de muestra debe deducirse de la absorbancia determinada para el ensayo correspondiente.

Métodos automatizados:

Las adaptaciones a los distintos analizadores (STA-R, BCT, BCS, etc.) están disponibles previa solicitud. **Los volúmenes de reconstitución pueden variar en función del instrumento automatizado utilizado. Consultar la adaptación y las precauciones específicas de cada instrumento.**

Nota:

— Si para el método utilizado se requieren volúmenes de reactivo mayores o menores que los indicados anteriormente, deben respetarse las mismas proporciones entre las concentraciones y los volúmenes respectivos de reactivo utilizados a fin de mantener el rendimiento del ensayo.
— Analizar un blanco de muestra en presencia de plasmas de aspecto muy lechoso por exceso de lípidos, de color amarillo por exceso de bilirrubina o hemolizados, o si los plasmas presentan un color diferente del habitual.

CALIBRACIÓN:

Puesto que BIOPHEN Heparin 3 ofrece una reactividad homogénea para HNF y HBPM, el ensayo puede calibrarse con **Biophen Heparin Calibrator (Ref. A222001)** para los distintos tipos de heparinas (5 concentraciones de 0 a 1,6 UI/ml).

Para la determinación de Orgaran® (danaparóide sódico) debe utilizarse un calibrador específico: **Biophen Orgaran® alibrador (Ref. A22201)** (5 concentraciones de 0 a 1,6 UI/ml).

Si se requiere un calibrador específico para HNF, **Biophen UFH Calibrator (Ref. A222301)** está disponible.

CONTROL DE CALIDAD:

El uso de plasmas de control de calidad permite validar la curva de calibración así como la reactividad homogénea del ensayo de Biophen Heparin para HNF y HBPM, entre distintos análisis, cuando se utilizan reactivos de un mismo lote. Se dispone de distintos tipos de controles:

Biophen UFH Control: (intervalo bajo) para HNF (Ref. A223101).

Biophen LMWH Control: (intervalo alto) para HBPM (Ref. A223001).

Biophen Orgaran® Control: (control para danaparóide sódico [Orgaran®]) (Ref. A223501).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO:

- La activación sanguínea, durante la obtención de la muestra y la preparación del plasma, puede provocar la liberación del factor plaquetario 4 (PF4), que es capaz de inhibir la heparina.
- No se observan interferencias significativas en las concentraciones de bilirrubina < 0,1 mg/ml, las concentraciones de hemoglobina < 2 mg/ml y las concentraciones de triglicéridos < 1,25 mg/ml añadidas a los plasmas. Niveles elevados de hemoglobina o triglicéridos pueden afectar a los resultados. Para sacar un rendimiento total del ensayo deben seguirse con atención las instrucciones de uso.
- Si la concentración de antitrombina III (AT III) en el plasma analizado es < 50%, puede que se infravalore la heparina como consecuencia de la falta de AT III. En tal caso, debe utilizarse un protocolo diferente con una fuente exógena de AT III.
- En algunos pacientes con amiloidosis se ha notificado una infravaloración de la concentración y resistencia de la heparina (6).
- Si se desea obtener un rendimiento óptimo del ensayo, deben seguirse estrictamente las instrucciones de uso.

RESULTADOS:

La concentración de heparina en la muestra analizada se deduce directamente de la curva de calibración. Los resultados se expresan en unidades internacionales de anti-Xa/ml (UI/ml).

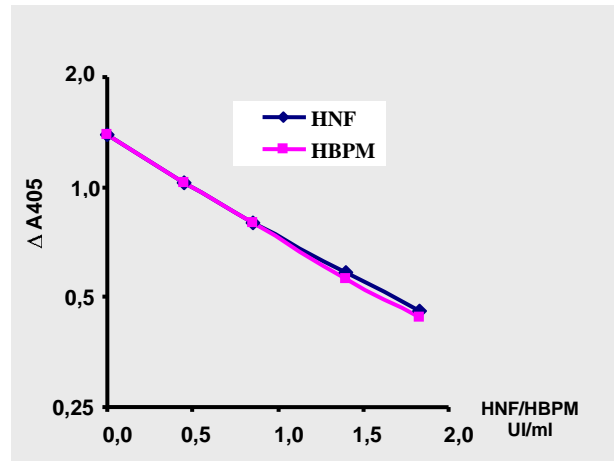
Mediante una escala semilogarítmica:

El ensayo es lineal hasta 1,0 UI/ml de anti-Xa para HNF.

El ensayo es lineal hasta 2,0 UI/ml de anti-Xa para HBPM.

EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRACIÓN:

Las curvas de calibración que se muestran a continuación, obtenidas con HNF o HBPM, solo se indican a modo de ejemplo. Debe utilizarse la curva de calibración generada para la serie de determinaciones llevadas a cabo.



CONTROL DE CALIDAD:

La curva de calibración es aceptable cuando las concentraciones determinadas para los plasmas de control se sitúan dentro del intervalo de aceptación.

Nota:

Debe incluirse al menos un control de calidad (a diferentes niveles) en cada serie a fin de validarla.

Debe generarse una nueva curva de calibración para cada nuevo lote de reactivos, tras una operación principal de mantenimiento del instrumento o si los valores determinados no se corresponden con lo previsto.

Cada laboratorio puede definir su propio intervalo de aceptación en función de los protocolos y los instrumentos utilizados.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS:

Esta reacción enzimática es rápida y permite obtener una gran sensibilidad para este análisis de heparina.

El umbral de detección es de 0,05 UI/ml.

Ejemplo de reproducibilidad obtenido con plasmas complementados con HNF o HBPM, utilizando el instrumento ACL-7000 (IL).

Muestra	% CV intraensayo	N	% CV interensayo	N
Nivel 1 HNF (0,38 UI/ml)	2,1	15	2,0	20
Nivel 2 HNF (0,74 UI/ml)	1,0	15	2,3	20
Nivel 3 HBPM (0,88 UI/ml)	0,9	15	1,5	20
Nivel 4 HBPM (1,32 UI/ml)	0,5	15	1,6	20
Nivel 1 bajo HBPM (0,25 UI/ml)	2,3	15	1,9	20
Nivel 2 bajo HBPM (0,50 UI/ml)	1,4	15	2,1	20

VALORES PREVISTOS:

Para obtener la eficacia correcta y el menor riesgo de sangrado, la dosis de heparina debe hallarse dentro del intervalo terapéutico recomendado por cada laboratorio farmacéutico, y para cada indicación específica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Hemker HC, Beguin S. The mode of action of heparin In-vitro and in-vivo. In: heparin and platelet polysaccharides Plenum Press, New York 221-230 (1992).
- Holm H A et al. Heparin assays and bleeding complication in deep venous thrombosis with particular reference retroperitoneal bleeding. Thromb Haemostasis 53: 278-281 (1985).
- Shannon M, Hirsh B and J. Treatment of venous thromboembolism. Thromb Haemostasis vol 82 (2): 870-877 (1999).
- Leslie B et al. Investigation of the anticoagulant mechanism of a covalent antithrombin-heparin complex J Biol Chem 52 (273): 34730-34736 (1999).
- Charles K M et al. Design synthesis and structure activity relationship of a series of arginine aldehydes factor Xa Inhibitors. Part 1: structure based on the (D)-Arg-Gly-Arg tripeptide sequence. Bioorganics Med chem Letter 10 (2000): 13-16 (1999).
- Christiansen J, Lindqvist B. Heparin resistance in amyloidosis. Acta Med Scand, 181(6) : 723-4, 1967.