



IVD

BIOPHEN™ DTI

REF CK012K

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

Chromogenní metoda při měření přímých inhibitorů trombinu (DTI).



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Poslední revize: 04/2021

POUŽITÍ:

BIOPHEN™ DTI souprava je určena pro in vitro chromogenní kvantitativní stanovení přímých inhibitorů (DTI) trombinu (FIIa) jako jsou Hirudin, Dabigatran a Bivalirudin v lidské citrátové plazmě za použití anti Ila manuální nebo automatické metody.

SHRNUTÍ:**Technické:**

BIOPHEN™ DTI souprava je určena pro chromogenní anti-Ila metodu specifickou na přímé inhibitory FIIa a není citlivá na přítomnost heparinu (UFH a LMWH)^{2,3}.

Klinické:

Přímé trombinové inhibitory (DTI) jako Dabigatran, Hirudin a Bivalirudin jsou používány jako prevence nebo léčba trombózy (venózní tromboembolismus, mrtvice, embolie, HIT...). DTI může být též měřen v plazmě, pokud je podezření na předávkování léku.^{1,4}

PRINCIP STANOVENÍ:

BIOPHEN™ DTI je chromogenní metoda založená na inhibici konstantního a v nadbytku přidaného množství trombinu (FIIa) DTI. Zbýlý trombin hydrolyzuje thrombin-specifický substrát (CS-01 (81)) za uvolnění paranitroalaninu (pNA). Množství uvolněného pNA (měřené při 405 nm) je nepřímo úměrné koncentraci DTI ve měřeném vzorku.

[DTI] + [FIIa v nadbytku] → [FIIa-DTI] + [reziduální FIIa]

[Zbytek FIIa] + Substrát → Peptide + pNA

REAGENCIE:

R1 Trombi specifický chromogenní substrát (CS-01(81)), lyofilizováno v přítomnosti stabilizátorů, heparin neutralizující látky a inhibitor polymerizace fibrinu.

R2 Lidský trombin, purifikovaný, lyofilizovaný v přítomnosti stabilizátorů. Obsahuje BSA.

R3 Tris-BSA pufr. Tris NaCl reakční pufr. Připravený k použití. Obsahuje BSA a malé množství azidu sodného (0,9 g/l).

R1 **R2** > 2 lahvičky po 2,5 ml.**R3** > 2 lahvičky po 25 ml.**UPOZORNĚNÍ:**

- Některé reagensy v soupravě obsahují materiál lidského a zvířecího původu. Lidská plazma použitá pro výrobu byla testována registrovanými metodami a shledána negativní na HIV 1, HIV 2, HCV a povrchové antigeny hepatitidy B. Žádný test nemůže zaručit stoprocentní absenci patogenních látek a proto by mělo být s materiálem manipulováno dle všech potřebných bezpečnostních předpisů pro materiál potenciálně infekční.
- V kontaktu s olověnými nebo měděnými trubkami může azid sodný vytvářet explozivní azidy kovů.
- Odpad likvidujte dle příslušných místních platných regulací.
- Používejte pouze reagensy stejné šarže.
- Studie stability prokazují, že reagensy mohou být převáženy při pokojové teplotě bez degradace.
- Pouze pro in vitro diagnostické použití v laboratoři.

H373: Může způsobit poškození orgánů opakovanou nebo prodlouženou expozicí.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Reagensy jsou lyofilizované v lahvičkách ve vakuu. Při otevírání lyofilizovaných reagensů opatrně odeberte zátku, aby se zabránilo ztrátě lyofilizátu.

R1 **R2** Každou lahvičku rozpustíte s 2,5 ml destilované vody. Opatrně míchejte, dokud se obsah úplně nerozpustí; zabraňte tvorbě pěny. Ihned po poromíchání vložte do analyzátoru dle specifického aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte reagensy stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18 – 25°C) a homogenujte před použitím.

R3 Reagensy připravena k použití. Homogenujte obsah před použitím a vložte do analyzátoru dle příslušného aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte reagensy stabilizovat při pokojové teplotě (18 – 25°C) po dobu 30 minut; homogenujte před použitím.

PODMÍNKY SKLADOVÁNÍ:

Neotevřené reagensy musí být skladovány při 2-8°C, ve svém originálním balení. Za těchto podmínek je stabilní až do doby expirace, která je vytištěna na každé krabici.

R1 **R2** Stabilita reagensy po rozpuštění, pokud je předejito kontaminaci a odpařování a pokud je reagensy skladována uzavřená, je:

- 4 týdny při 2-8°C.
- 24 hodin za pokojové teploty (18-25°C)
- 2 měsíce při -20°C nebo méně*.
- Stabilita v analyzátoru: Viz specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

*Rozmrazujte pouze jednou co nejrychleji při 37°C a ihned použijte.

R3 Stabilita reagensy po otevření, pokud je předejito kontaminaci a odpařování a pokud je reagensy skladována uzavřená, je:

- 8 týdnů při 2-8°C.
- 7 dní za pokojové teploty (18-25°C)
- Stabilita v analyzátoru: Viz specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

Pokud substrát žloutne, je kontaminovaný. Odstraňte kontaminovaný substrát a načněte novou lahvičku.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEOBSAŽENÝ:**Reagensy:**

- Destilovaná voda.
- 20% kyselina octová nebo 2% kyselina citrónová (End point metoda).
- Referenční materiál pro DTI, který má být testován (mezinárodní nebo vnitřní standard, farmaceutický přípravek atp.), nebo specifické kalibrátory a kontroly se známou hladinou, například:

Kalibrátory	BIOPHEN™ Dabigatran Plasma Calibrator / Calibrator Low	Plasma Hirudin Standart Low / High	BIOPHEN™ Bivalirudin Calibrator
Katalogové č.	222 801 / 222 901	SC020K / SC020L	266701
Kontroly	BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma / Low	Plasma Hirudin Control	BIOPHEN™ Bivalirudin Control
Referenční č.	224 701 / 225 001	SC025K	225701

Dále odkazujeme na specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

Materiál:

- Spektrofotometr, fotometr nebo automatický přístroj na chromogenní testování.
- Stopky, kalibrované pipety, plastové zkumavky.

ODBĚR VZORKU:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M tri-sodného citrátového antikoagulantia (1 díl; 0,109M, 3,2%), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů.

Pro skladování plazmy odkazujeme na reference^{5,6}**PROVEDENÍ:**

Souprava je určena pro kinetickou automatickou nebo manuální (end-point) metodu. Stanovení se provádí při teplotě 37°C a vývoj zbarvení je měřen 405 nm.

Manuální metoda:

1. Rozpusťte kalibrátory dle jejich pokynů. Kalibrační plazmy by měly být ředěny v **R3** pufru dle tabulky níže:

Kalibrátor	Referenční číslo	Ředění v R3
BIOPHEN™ Dabigatran Plasma Calibrator	222801	1:10
BIOPHEN™ Dabigatran Calibrator Low	222901	1:2
BIOPHEN™ Bivalirudin Calibrator	226701	1:2

Pro Hirudin může být použita poolovaná plazma se známou hladinou Hirudinu. Kalibrační plazmy by měly být připraveny a ředěny v **R3** pufru, viz níže:

Hirudin, nízké rozmezí (SC020K)	µg/ml	0	0,5	1	1,5	2
Normální plazma s 2 µg/ml Hirudinu (µl)		0	25	50	75	100
Normální plazma (µl)		100	75	50	25	0
Pufr R3		900	900	900	900	900



Hirudin, vysoké rozmezí (SC020L)	µg/ml	0	1,25	2,50	3,75	5
Normální plazma s 5 µg/ml Hirudinu (µl)		0	25	50	75	100
Normální plazma (µl)		100	75	50	25	0
Pufr R3		2400	2400	2400	2400	2400

2. Vzorky a kontroly by měly být ředěny za použití dilučního pufru R3, viz níže.

Vzorek	Referenční č.	Ředění
BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma	224 701	1:10
BIOPHEN™ Dabigatran Control Low	225 001	1:2
Testovaná plazma	-	1:10 (standardní rozsah) 1:2 (nízký rozsah)
Vzorek	Reference	Ředění v R3
BIOPHEN™ Bivalirudin Control	225701	1:2
Vzorky	-	1:2
Vzorky	Reference	Ředění v R3
		Vysoké rozmezí
		Nízké rozmezí
Plazma Hirudin Control	SC025K	1:25
Vzorky	-	1:25

Stanovte kalibrační křivku a zkontrolujte ji s kontrolami kvality. Ředěné plazmy skladované při pokojové teplotě musí být testovány co nejdříve. Přesné koncentrace kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny na letáku, přiloženém ke každému kitu.

3. Pro manuální metodu připravte do plastové zkumavky nebo mikrotitrační destičky při 37°C následovně:

Reagencie	Zkumavka	Mikrodestička
Ředěný kalibrátor, kontroly, testovaná plazma	200 µl	50 µl
R1: Thrombin specifický, chromogenní Substrát	200 µl	50 µl
Promíchejte a inkubujte při 37°C po dobu 2 minut přesně, potom přidejte:		
R2: Lidský Thrombin předehřátý na 37°C	200 µl	50 µl
Promíchejte a inkubujte při 37°C po dobu 2 minut přesně, poté zastavte přidáním		
Kyselina citronová (2%)*	400 µl	100 µl
Promíchejte a měřte vývoj zbarvení při 405 nm proti blanku		

*Nebo kyselinu octovou (20%). Žlutá barva je stabilní po dobu 2 hodin.

Blank vzorku obdržíte mícháním reagentů v opačném pořadí postupu testu. (Kyselina citronová 2%, R2, R1, rozpuštěný vzorek).

Optickou hustotu měřte při 405 nm. Blank vzorky odečítejte od naměřené hodnoty. Udělejte slepý vzorek v přítomnosti vysoce lipemických, ikterických nebo hemolytických plazem – nebo pokud má plazma jinou barvu než je obvyklé.

Pokud jsou požadovány jiné reakční objemy, musí být jejich poměry pro každou reagentii přísně dodržovány. Osoba provádějící tyto změny je zodpovědná za jakékoliv změny a jejich důsledky na výsledky.

Kinetická metoda:

Test může být proveden i kinetickou metodou. V tom případě je absorbance zaznamenána od 10 do 100 sekundy po přidání substrátu (ΔA405). V tom případě není nutné odečítat blank nebo zastavovat reakci.

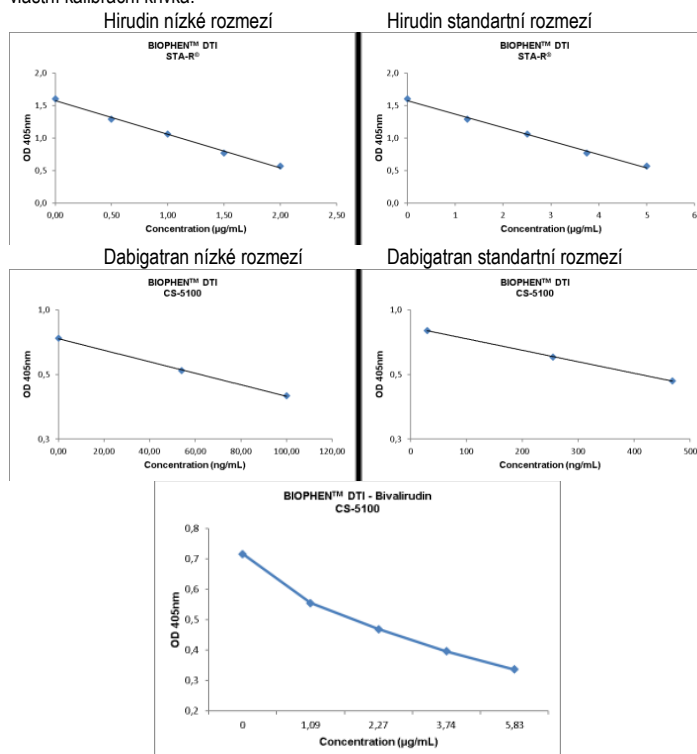
Pro automatickou metodu jsou dostupné aplikační protokoly na vyžádání. Odkazujeme na specifické aplikační protokoly a bezpečnostní opatření pro použité analyzátor.

KALIBRACE:

BIOPHEN™ DTI test může být kalibrován pro testování Přímých Inhibitorů Trombinu (DTI), například Dabigatran, Hirudin a Bivalirudin. Kalibrátory plazmy zahrnující celé rozmezí kalibrace jsou k dispozici od HYPHEN BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ). Tyto kalibrátory mohou být použity ke stanovení kalibrační křivky specifického testovaného analytu.

- Standardní rozmezí pro Dabigatran je přibližně od 0 až 500 ng/ml.
- Nízké rozmezí pro Dabigatran je přibližně od 0 do 110 ng/ml a 0 až 2 µg/ml pro Hirudin.
- Vysoké rozmezí pro Hirudin je přibližně od 0 do 5 µg/ml.
- Rozmezí kalibrace pro Bivalirudin je přibližně od 0 do 5 µg/ml.

Kalibrační křivky uvedeny níže jsou pouze příklad. Pro vlastní měření musí být stanovena vlastní kalibrační křivka.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrolních plazem umožňuje jak validaci kalibrační křivky, tak i homogenní reaktivity mezi sériemi při použití stejné šarže reagentie. Provedte kontrolu kvality v každé sérii pro validaci měření.

Nová kalibrační křivka by měla být stanovena nejlépe pro každou sérii testů a alespoň pro každou navou šarži reagentie, při opravě analyzátoru, nebo pokud jsou naměřené hodnoty mimo přijatelné rozmezí pro použitou metodu.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné rozmezí měření a verifikovat jej na svém analytickém systému.

VÝSLEDKY:

- Při použití manuální End-Point metody vykreslujte kalibrační křivku s odpovídající absorbancí OD 405nm na ose Y a koncentrací analytu na ose X.
 - Pro Dabigatran použijte semilogaritmický (Log-Lin) grafický papír (ng/ml - OD).
 - Pro Hirudin použijte lineární (Lin-Lin) grafický papír (µg/ml - OD).
 - Pro Bivalirudin použijte lineární (Lin-Lin) grafický papír (µg/ml - OD) v polynomu 3 řádu.
- Pro kinetickou metodu použijte ΔOD 405 místo OD 405.
- Koncentrace DTI v měřeném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Výsledky pro Dabigatran jsou v ng/ml a pro Hirudin a Bivalirudin v µg/ml.
- Pokud jsou použita jiná ředění, musí být získané hodnoty násobené použitým dilučním poměrem.
- Výsledky by měly být interpretovány dle klinického a biologického stavu pacienta.

LIMITY:

- Pro získání optimálních výsledků musí být pečlivě dodrženy pracovní podmínky validované výrobcem Hyphen-BioMed. Případné změny provedené uživatelem by měly být validovány.
- Jakékoliv reagentie s neobvyklým vzhledem nebo projevující známky kontaminace musí být vyřazeny.
- Jakékoliv podezřelá plazma nebo vykazující známky aktivace musí být vyřazena.
- Vysoce koncentrované vzorky mohou být před-ředěny s normální poolovanou plazmou. Naměřené koncentrace musí být násobeny použitým dilučním faktorem.

PŘEDPOKLÁDANÉ VÝSLEDKY:

Dabigatran, Hirudin a Bivalirudin se nenachází přirozeně v plazmě.

Normální interval, terapeutické rozmezí a rozmezí krvácivého rizika by měly být definované dle místních platných regulací.



CHARAKTERISTIKA:

- Dolní limit a měřicí rozmezí jsou definovány použitým analytickým systémem.
- Měřicí rozmezí Dabigatranu závisí na použitém analytickém systému (kolem 15 do 120 ng/ml pro nízké rozmezí nebo 20 až 500 ng/ml pro standardní rozmezí na STA-R® sérii nebo CS-sérii).
- Měřicí rozmezí Hirudinu závisí na použitém analytickém systému (kolem 0,15 do 2 µg/ml pro nízké rozmezí nebo 0,30 až 5 µg/ml pro standardní rozmezí na STA-R® sérii).
- Měřicí rozmezí Bivalirudinu závisí na použitém analytickém systému (kolem 0,5 do 15 µg/ml na CS-sérii s dalším ředěním).
- Studie výkonu byly provedeny vnitřně na 1 šarži reagentie na Sysmex CS-sérii a STA-R® sérii. Výsledky byly posouzeny s laboratorními kontrolami. Následující výsledky byly zjištěny:

Vzorky	Intra série			Inter série		
	N	Průměr	CV%	N	Průměr	CV%
Dabigatran nízké rozmezí hladina 1	6	28,8 ng/ml	5,3	8	23,4 ng/ml	10,7
Dabigatran nízké rozmezí hladina 2	6	86,2 ng/ml	4,1	8	79,4 ng/ml	3,0
Dabigatran vysoké rozmezí hladina 1	6	111,2 ng/ml	1,4	6	110,8 ng/ml	2,4
Dabigatran vysoké rozmezí hladina 2	6	280,5 ng/ml	2,4	6	281,8 ng/ml	2,4
Hirudin hladina 1	10	1,00 µg/ml	4,8	4	1,26 µg/ml	<5
Hirudin hladina 2	10	2,00 µg/ml	1,5	4	2,16 µg/ml	<5
Bivalirudin hladina 1	40	1,62 µg/ml	0,7	10	1,64 µg/ml	2,4
Bivalirudin hladina 2	40	3,95 µg/ml	0,7	10	4,0 µg/ml	2,7

- Korelace s referenční metodou (BIOPHEN DTI vs LC:MS/MS)
N = 101 $y = 0,925x + 10,46$ $r = 0,987$
- **Měření není citlivé na heparin (UFH a LMWH) při normálních koncentracích.**
- Vliv progresivních trombinových inhibitorů je zanedbatelný díky krátké době inkubace.
- **Interference:** Odkazujeme na specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

REFERENCE:

1. Greinacher A and Warkentin T. The direct thrombin inhibitor hirudin, *Thromb Haemost.* 2008.
2. Schramm *et al.* Development of a chromogenic substrate for the determination of hirudin in plasma, *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1991.
3. Amiral J *et al.* An update on laboratory measurements of Dabigatran: Smart specific and calibrated dedicated assays for measuring anti-IIa activity in plasma. *Transfusion and Apheresis Science.* 2016.
4. Poli *et al.* Diagnostic accuracy of a novel chromogenic direct thrombin inhibitor assay: clinical experiences for Dabigatran monitoring. *Thromb Haemost.* 2017.
5. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
6. Woodhams B *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood coagulation and Fibrinolysis.* 2001.

SYMBOLY:

Symboly použité jsou v seznamu ISO 15223-1 standard – viz dokument definice symbolů.

