



HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors

REF CK002K R1 R2 3 x 1 ml

REF CK002L R1 R2 3 x 2,5 ml

IVD

Anti-lia koagulační metoda pro měření Dabigatranu a dalších přímých inhibitorů thrombinu.



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

Revize:03_2022

POUŽITÍ:

HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors souprava je anti-lia koagulační metoda pro in vitro kvantitativní měření přímých inhibitorů thrombinu (DTI) v lidské citrátové plazmě manuální nebo automatickou metodou.

Měření DTI koncentrace je vhodné pro monitorování pacientů s terapií Argatrobanem nebo Bivalirudinem nebo jako způsob detekce antikoagulans (Dabigatran) u pacientů s antikoagulační léčbou.

Souprava je pro in vitro použití vyškoleným personálem.

SHRNUTÍ:

Technické¹⁻³:

HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors souprava je koagulační metoda anti-lia, založená na inhibici konstantní hladiny trombinu pro stanovení anti-lia aktivity DTI. Jsou potřebné specifické kalibrátory.

Klinické³⁻⁷:

Měření koncentrace přímých inhibitorů trombinu může pomoci správně pacientů s DTI terapií (např.: Před operacemi, pro pacienty s rizikem krvácení, s trombotickými nebo krváčovými příhodami, nebo při podezření na předávkování).

PRINCIP:

HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors metoda je koagulační test (ředěný trombinový čas) pro měření koncentrace Dabigatranu nebo jiných DTI v lidské plazmě. Koagulace je zahájena přidáním vysoce purifikovaného lidského trombinu v α -trombin podobě, test probíhá v přítomnosti vápníku. Ziskany srážecí čas závisí na koncentraci Dabigatranu (nebo ostatních DTI) v měřeném vzorku.

REAGENCIE:

R1 Normální poolová plazma, lyofilizováno v přítomnosti stabilizátorů.

R2 Lidský trombin s vápníkem, vysoce purifikovaný, přibližně 1 NIH/ml na (h)IIa; lyofilizováno v přítomnosti stabilizátorů. Obsahuje BSA.

Koncentrace enzymu v **R2** je upravena pro každou šarži tak, aby se zajistila optimální reaktivita a linearita měření.

Produkt není klasifikován jako nebezpečný, a proto se na něj nevztahuje regulace EC 1272/2008 (CLP) o označení chemikálií.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagencie v soupravě obsahují materiál lidského a zvířecího původu. Lidská plazma použitá pro výrobu reagensů byla testována registrovanými metodami a shledána negativní na přítomnost protilátek na HIV 1, HIV 2 a HCV, a povrchového antigenu HCV. I přesto nemůže být zaručena naprostá absence infekčních agens, a proto musí být s reagensy zacházeno jako s potenciálně infekčními se všemi příslušnými opatřeními.
- Znehodnocení odpadu by mělo být vždy v souladu s lokálními předpisy.
- Používejte pouze reagencie stejné šarže.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Abyste zabránili ztrátě produktu, lahvičky otevřete opatrně.

R1 R2 Rozpusťte obsah každé lahvičky v přesně:

REF CK002K > 1 ml destilované vody.

REF CK002L > 2,5 ml destilované vody.

Rádně promíchejte, dokud se obsah nerozpustí, zabraňte tvorbě pěny při míchání a vložte do analyzátoru dle specifického aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte stabilizovat 15 minut při pokojové teplotě (18 – 25°C) a homogenizujte před použitím.

Plazmatická reagencie může být více či méně zakalená po rozpuštění. Turbidita je způsobená plazmatickými lipidy, které jsou po lyofilizaci „méně“ rozpustné a mohou tvořit depozita. Nechte každou lahvičku stabilizovat 10 minut při pokojové teplotě a promíchejte před použitím.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Reagencie musí být skladována při 2-8°C ve svém originálním obalu. Je pak stabilní do data expirace uvedeného na krabičce.

R1 R2 Stabilita otevřené reagencie po rozpuštění, pokud je zabráněno kontaminaci nebo odpařování a je skladována uzavřená, je:

- 24 hodin při 2 - 8°C
- 8 hodin při pokojové teplotě (18 – 25°C)
- 2 měsíce při -20°C a méně*
- Stabilita v analyzátoru: viz specifický aplikační protokol.

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

Nekombinujte způsoby skladování.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V SOUPRAVĚ NEPŘÍTOMNÝ:

- Ředící pufr: Imidazol pufr (AR021A/K/L) nebo fyziologický roztok (0,9% NaCl). Použijte stejný pufr pro všechna měření.
- Referenční materiál pro měření DTI, nebo specifické kalibrátory a kontroly se známou hladinou DTI, jako jsou:

Název produktu	Referenční číslo
Argatroban Plasma Calibrator	SC030K
Argatroban Control Plasma	SC035K
BIOPHEN™ Dabigatran Plasma Calibrator	222801
BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma	224701
BIOPHEN™ Dabigatran Calibrator Low	222901
BIOPHEN™ Bivalirudin Calibrator	226701
BIOPHEN™ Bivalirudin Control	225701

- Vodní lázeň, semi-automatický nebo automatický analyzátor pro koagulační měření.
- Stopy; Kalibrované pipety; Zkumavky z plastu nebo silikonového skla.

PŘÍPRAVA A ODBĚR VZORKU:

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

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů (CLSI H21-A5⁸).

Pro skladování plazmy se odkáže na reference⁸.

PROVEDENÍ TESTU:

Souprava může být použita pro manuální nebo automatickou metodu. Provádějte test při 37°C a měřte čas koagulace, který je započatý přidáním **R2**

Pro automatickou metodu jsou k dostání na vyžádání aplikační protokoly pro použití analyzátoru.

Manuální metoda:

1. Připravte kalibrátory a kontroly dle jejich specifických instrukcí. Kalibrátory by měly být ředěny v dilučním pufru, viz níže:

Kalibrátor	Referenční číslo	Ředění
BIOPHEN Dabigatran Plasma Calibrator	222801	1:8
BIOPHEN Dabigatran Calibrator Low	222901	1:2
Argatroban Plasma Calibrator	SC030K	1:8
BIOPHEN Bivalirudin Calibrator	226701	1:10

2. Naředte vzorky a kontroly v dilučním pufru, dle tabulky níže:

Vzorky	Referenční číslo	Ředění
BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma	224701	1:8
BIOPHEN™ Dabigatran Control Low	225001	1:2
Vzorky	-	1:8 (standardní rozmezí) 1:2 (nízké rozmezí)
Vzorky	Referenční číslo	Ředění
Argatroban Control Plasma	SC035K	1:8
Vzorky	-	1:8
Vzorky	Referenční číslo	Ředění
BIOPHEN™ Bivalirudin Control	225701	1:10
Vzorky	-	1:10

Stanovte kalibrační křivku a ihned proveďte kontrolu kvality, abyste zajistili optimální výkon testu. Pokud jsou vzorky skladovány za pokojové teploty (18 – 25°C), testujte vzorky co nejdříve. Přesné koncentrace kontrol a kalibrátorů jsou uvedeny na etiketu v balení každé šarže.

3. Do plastové zkumavky, inkubované při 37°C, přidejte:

	Objem
Naředěné vzorky, kontroly a kalibrátory	50 µl
R1 Normální poolová plazma	100 µl
Míchejte a inkubujte při 37°C po dobu 1 minuty (2 minuty pro Bivalirudin) pak přidejte následující a zapněte stopky:	
R2 Lidský calcium trombin, předinkubovaný na 37°C	100 µl
Zaznamenejte čas koagulace (CT, sekundy).	

Pokud jsou zapotřebí jiné reakční objemy, musí být poměry objemů přísně zachovány. Laboratoř je zodpovědná za validaci všech změn a jejich dopadu na výsledky testu.

KONTROLA KVALITY:

Kontrolou kvality validujete homogenitu metody mezi sériemi pro danou šarži reagensů. Začínáte kontrolu kvality do každé série testů pro validaci testu. Nová kalibrační křivka by měla být stanovena nejlépe pro každou novou sérii testů, při nové šarži reagensů, po opravě analyzátoru, nebo pokud jsou naměřené kontroly kvality mimo přijatelné rozmezí.

Každá laboratoř si musí stanovit svoje vlastní přijatelné rozmezí a verifikovat předpokládaný výkon na svém analyzátoru.



ÝSLEDEK:

- Pro manuální metodu vypište kalibrační křivku bi-lineárně s koagulačním časem (v sekundách) podél osy Y a koncentraci DTI podél osy X.
- Výsledky Dabigatranu (a ostatních DTI) jsou přímo odečteny z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Výsledky jsou vyjádřeny v ng/ml pro Dabigatran a v µg/ml pro Argatroban a Bivalirudin.
- Výsledky by měly být interpretovány dle klinického a biologického stavu pacienta.

LIMITY:

- Abyste zajistili optimální výkon testu, přesně následujte technické instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.
- Jakákoliv reagencie neobvyklého vzhledu nebo vykazující známky kontaminace musí být znehodnocena.
- Jakýkoliv podezřelý vzorek nebo vzorek vykazující známky aktivace musí být znehodnocen.
- Vzorky s vysokou koncentrací mohou být před-ředěny poolovou plazmou nebo imidazolovým pufrům. Naměřená koncentrace musí být násobena použitým ředícím faktorem.
- Uživatelé definované léky nejsou podporovány výrobcem HYPHEN BioMed, jelikož mohou ovlivnit výsledky měření. Jakékoliv změny a jejich dopad na metodu musí být validovány.

PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY:

Anti-IIa léky nejsou přítomny v normální plazmě.

Normální rozmezí, terapeutické rozmezí a krvácivé riziko by mělo být definováno dle současných doporučení.

CHARAKTERISTIKA:

- Nižší limit detekce analyzátoru a rozmezí měření záleží na použitém analytickém systému.
- Kalibrační rozmezí je kolem:

Dabigatran Nízké rozmezí	Dabigatran Standardní rozmezí
0,120 ng/ml	50-500 ng/ml
Argatroban	Bivalirudin
0-2 µg/ml	0-5 µg/ml

- HEMOCLOT Thrombin Inhibitors reagencie **neobsahuje inhibitory heparinu**. Přítomnost jiných inhibitorů heparinu nebo thrombinu v testované plazmě, než které jsou testovány, může způsobit prodloužený čas koagulace.
- Studie výkonu byly provedeny interně na Sysmex-CS sérii a STAR-sérii. Výkon byl posouzen laboratorními kontrolami po dobu 5 dní, 2 série denně a 2 opakování v každé sérii pro každou kontrolní hladinu. Následující hodnoty byly získány:

Kontroly	Intra assay				Inter assay			
	N	Průměr	CV%	SD	N	Průměr	CV%	SD
Dabigatran Low	30	80 ng/ml	3,7	3,0	20	77 ng/ml	2,1	1,6
Dabigatran	20	292 ng/ml	2,4	6,9	20	286 ng/ml	4,1	11,7
Bivalirudin	40	4,27 µg/ml	2,1	0,09	10	4,14 µg/ml	3,1	0,13
Argatroban	20	1,24 µg/ml	1,8	0,02	12	1,32 µg/ml	2,5	0,03

- Dle principu testu není očekávaná žádná interference deficitu koagulačních faktorů, jako jsou Faktor II, V, X, AT nebo nízký fibrinogen.
- Korelace s referenční metodou (LCMS:MS vs HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors, Dabigatran)²:
Sysmex CS-2000i : n = 100 y = 0,926x + 10,46 r = 0,987
Pro ostatní molekuly viz specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.
- Interference: Viz specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

REFERENCE:

1. Antovic J.P. *et al.* Evaluation of coagulation assays versus LC-MS/MS for determinations of dabigatran concentrations in plasma. Eur J Clin Pharmacol. 2013.
2. 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
3. Amiral C. *et al.* Measurement of Bivalirudin Thrombin Inhibition Activity in Plasma with Clotting or Chromogenic Assays and Dedicated Calibrators and Controls. Thrombosis & Haemostasis: Research. 2021.
4. Van Cott EM *et al.* Laboratory Monitoring of Parenteral Direct Thrombin Inhibitors. Semin. Thromb. Haemost. 2017.
5. Kyrle P.A. *et al.* Dabigatran :patient management in specific clinical settings. Wien Klin Wochenschr. 2014.
6. Gosselin R.C. *et al.* International council for standardization in haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of direct oral anticoagulants. Thrombosis and Haemostasis. 2018
7. Amiral C. *et al.* Measurement of Bivalirudin Thrombin Inhibition Activity in Plasma with Clotting or Chromogenic Assays and Dedicated Calibrators and Controls. Thrombosis & Haemostasis: Research. 2021
8. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008

SYMBOLY:

Použitá symboly a znaky jsou uvedeny v seznamu ISO 15223-1 Standard, viz dokument Definice symbolů.

