

HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors



REF CK002K R1 R2 3 flacons x 1 mL

REF CK002L R1 R2 3 flacons x 2,5 mL

IVD

Français, révision : 03-2022

UTILISATION:

Méthode coagulante anti-IIa pour la détermination quantitative *in vitro* des Inhibiteurs Directs de la Thrombine (DTI), dans le plasma humain citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée. Cette méthode sert au suivi des patients sous traitement Argatroban et Bivalirudine et sert d'aide au diagnostic pour la détection du statut anticoagulant (Dabigatran) chez les patients sous thérapie par anticoagulants.

Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

RESUME ET EXPLICATION:

Technique :¹⁻³

Le coffret HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors est une méthode coagulante anti-IIa, basée sur l'inhibition d'une quantité constante de thrombine, pour déterminer l'activité anti-IIa des DTIs en utilisant des étalonnages spécifiques.

Clinique :³⁻⁷

La mesure de la concentration en DTI peut, dans certaines situations cliniques, aider à la prise en charge des patients recevant un traitement DTI (ex : avant chirurgie, pour les patients présentant un facteur de risque associé à un accident hémorragique, pour les patients présentant des épisodes thrombotiques ou hémorragiques, ou en cas de suspicion de surdosage).

PRINCIPE:

L'HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors est une méthode (temps de thrombine dilué) pour doser la concentration de Dabigatran ou autres DTIs en plasma. L'échantillon dilué à tester est mélangé à un pool de plasma humain normal, puis la coagulation est déclenchée par ajout d'une concentration constante de thrombine humaine, en présence de calcium. Le temps de coagulation (TC) obtenu est fonction de la concentration de Dabigatran (ou autre DTI) présent dans le plasma à tester.

REACTIFS:

R1 Pool de plasma normal, lyophilisé. Contient des stabilisants.

R2 Thrombine calcique humaine, hautement purifiée, à environ 1 NIH/mL de Ila(h), lyophilisée. Contient de la BSA et des stabilisants.

La concentration enzymatique du **R2** est ajustée si nécessaire pour chaque lot afin d'obtenir la réactivité et linéarité optimales pour le dosage.

Le produit est classé non dangereux et n'est pas soumis à un étiquetage selon le règlement CE n° 1272/2008 [CLP].

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-VHC, anti-VIH 1 et anti-VIH 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.

PREPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R1 **R2** Reconstituer chaque flacon avec exactement :

REF CK002K → 1 mL d'eau distillée.

REF CK002L → 2,5 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du Guide d'Application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 15 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

Le réactif plasmatique peut être plus ou moins trouble après reconstitution. Ce trouble est essentiellement lié aux lipides plasmatiques qui, après lyophilisation, deviennent « moins » solubles et peuvent former un léger dépôt. Si nécessaire, laisser stabiliser les flacons 10 minutes à température ambiante et homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R1 **R2** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 24 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- 2 mois congelé à -20°C ou moins*
- Stabilité à bord de l'automate : se référer au Guide d'Application spécifique.

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

Les combinaisons de conservation ne sont pas recommandées.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

- Tampon de dilution : tampon Imidazole (AR021B / AR021K / AR021L / AR021M / AR021N) ou solution saline (0.9% NaCl). Utiliser le même tampon pour tous les tests réalisés.
- Etalons et contrôles spécifiques avec titration connue, tels que :

| Réactif | Référence |
|---------------------------------------|-----------|
| Argatroban Plasma Calibrator | SC030K |
| Argatroban Control Plasma | SC035K |
| BIOPHEN™ Dabigatran Plasma Calibrator | 222801 |
| BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma | 224701 |
| BIOPHEN™ Dabigatran Calibrator Low | 222901 |
| BIOPHEN™ Dabigatran Control Low | 225001 |
| BIOPHEN™ Bivalirudin Calibrator | 226701 |
| BIOPHEN™ Bivalirudin Control | 225701 |

- Instrument automatique pour tests coagulant tel que : CS-series, STA-R® family, ACL-TOP® family.
- Équipement et matériel de laboratoire.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche.

La collecte, la préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁸ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{6,8}.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode manuelle ou automatisée. Le test est réalisé à 37°C, et le temps de coagulation, déclenché par l'ajout de **R2**, est mesuré.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage (méthode manuelle) :

1. Reconstituer les étalons et contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans le tampon de dilution comme décrit dans le tableau ci-dessous :

| Étalon | Référence | Dilution |
|---------------------------------------|-----------|----------|
| 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. Diluer les échantillons et contrôles dans le tampon de dilution, comme décrit dans le tableau ci-dessous :

| Echantillons | Référence | Dilution |
|------------------------------------|-----------|---|
| BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma | 224701 | 1/8 |
| BIOPHEN™ Dabigatran Control Low | 225001 | 1/2 |
| Echantillons | NA | 1/8 (gamme standard) 1/2 (gamme basse) |
| Echantillons | Référence | Dilution |
| Argatroban Control Plasma | SC035K | 1/8 |
| Echantillons | NA | 1/8 |
| Echantillons | Référence | Dilution |
| BIOPHEN™ Bivalirudin Control | 225701 | 1/10 |
| Echantillons | NA | 1/10 |

Réaliser la gamme de calibration et la tester rapidement avec les contrôles de qualité pour une performance optimale du dosage. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans un tube plastique incubé à 37°C:

| | Volume |
|--|--------|
| Echantillon, contrôles ou étalons dilués | 50 µL |
| [R1] Pool de plasma normal. | 100 µL |
| Mélanger et incubé à 37°C, pendant 1 minute (2 minutes pour la Bivalirudine) puis introduire, en déclenchant le chronomètre : | |
| [R2] Thrombine Calcique humaine, Préincubée à 37°C | 100 µL |
| Noter le temps de coagulation (TC, en secondes) | |

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration lin-lin en portant en ordonnées le temps de coagulation (sec) et en abscisses la concentration de DTI.
- La concentration de Dabigatran (ou autre DTI) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, si la dilution standard est utilisée.
- Les résultats sont exprimés en ng/mL pour le Dabigatran, ou en µg/mL pour l'Argatroban ou la Bivalirudine.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif ne présentant pas d'aspect limpide ou présentant des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Les échantillons fortement concentrés peuvent être pré-dilués dans un pool de plasmas normaux ou en tampon Imidazole. Les concentrations mesurées doivent alors être multipliées par le facteur de dilution complémentaire.
- Les modifications définies par l'utilisateur ne sont pas prises en charge par HYPHEN BioMed car elles peuvent affecter les performances du système et les résultats des tests. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les modifications apportées à ces instructions ou l'utilisation des réactifs sur d'autres instruments que ceux inclus dans les Guides d'Application HYPHEN BioMed ou ces instructions d'utilisation.

VALEURS ATTENDUES:

Les médicaments anti-IIa sont absents des plasmas normaux. Pour chaque médicament anti-IIa, la zone normale, la zone thérapeutique et la zone de risque hémorragique doivent être définies conformément aux recommandations locales en vigueur.

PERFORMANCES:

- La limite basse et la zone de mesure dépendent du système analytique utilisé.
- Les zones de calibration sont d'environ :

| Dabigatran Gamme basse | Dabigatran Gamme standard | Argatroban | Bivalirudine |
|------------------------|---------------------------|------------|--------------|
| 0-120 ng/mL | 0-500 ng/mL | 0-2 µg/mL | 0-5 µg/mL |

- 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.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-series ou STA-R® family. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

| Contrôle | Intra-essai | | | | Inter-essais | | | |
|----------------|-------------|------------|-----|------|--------------|------------|-----|------|
| | N | Moy. | CV% | SD | n | Moy. | 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 |
| Bivalirudine | 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 |

- Selon le principe de dosage, aucune interférence due à un déficit en facteur de coagulation, tel que les facteurs II, V, X, AT ou faible en fibrinogène, n'est attendue.
- Corrélation avec une autre méthode (LCMS:MS vs HEMOCLOT™ Thrombin Inhibitors, Dabigatran)²:
Sysmex CS-2000i : n = 100 $y = 0,926x + 10,46$ $r = 0,987$
Pour les autres molécules, se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.
- Interférences : Se référer au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

- 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.
- 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.
- 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.
- Van Cott EM *et al.* Laboratory Monitoring of Parenteral Direct Thrombin Inhibitors. Semin. Thromb. Haemost. 2017.
- Kyrie P.A. *et al.* Dabigatran: patient management in specific clinical settings. Wien Klin Wochenschr. 2014.
- Gosselin R.C. *et al.* International council for standardization in haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of direct oral anticoagulants. Thrombosis and Haemostasis. 2018.
- 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
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.

Changements par rapport à la précédente version.

Les symboles suivants peuvent apparaître dans l'étiquetage du produit :

| | | | | | |
|-------------------------|--|-------------|---|-----------------|--|
| REF | Référence catalogue | LOT | Désignation du lot | IVD | Dispositif médical de diagnostic <i>in-vitro</i> |
| Rx | Identification numérique < x> du réactif | | Lire le mode d'emploi | WHO STD | Code du standard OMS |
| | Températures limites de conservation | | Fabricant | | YYYY-MM-DD Utilisable jusqu'à |
| CE | Marquage de conformité CE avec le numéro d'identification de l'organisme notifié | | Volume de reconstitution | CONTENTS | Contenu |
| Cx | Identification numérique < x> du contrôle | i-MA | Consulter les instructions fournies dans le guide d'application de la méthode | CONTAINS | Contient |
| EXP | Date d'expiration | | Suffisant pour <n> tests | UNIT | Unité de mesure |
| TARGET VALUE | Valeur cible | | Maintenir hors de portée de la lumière du soleil et de la chaleur | CALx | Identification numérique < x> du calibrateur |
| ACCEPTANCE RANGE | Intervalle d'acceptation | | | | Risque biologique |