



BIOPHEN™ DTI

REF 220202



[R1] [R2] 2 x 2,5 mL, [R3] 2 x 25 mL



Méthode chromogène pour le dosage des inhibiteurs directs de la thrombine (DTI).

Français, dernière révision : 04-2021

UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ DTI est une méthode chromogène anti-IIa proposée pour la détermination quantitative *in vitro* des inhibiteurs directs de la thrombine (FIIa) (DTI) type Dabigatran, Hirudine ou Bivalirudine, sur plasma humain citraté, en utilisant une méthode automatisée ou manuelle.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION:

Technique :

Le coffret BIOPHEN™ DTI est une méthode chromogène anti-IIa spécifique de l'inhibiteur direct du FIIa et insensible aux héparines (HNF et HBPM).^{2,3}

Clinique :

Les inhibiteurs directs de la thrombine (DTI) tels que Dabigatran, Hirudine, Bivalirudine sont utilisés dans divers contextes visant à prévenir et traiter les situations à risque thrombotique (ex : thromboembolie veineuse, AVC, TIH ...). Lorsque nécessaire, le DTI peut être mesuré dans le plasma en cas de suspicion d'un excès d'activité anticoagulante.^{1,4}

PRINCIPE:

La méthode BIOPHEN™ DTI est un dosage chromogène basé sur l'inhibition, par le DTI à doser, d'une quantité constante et en excès de thrombine (FIIa). La thrombine résiduelle hydrolyse le substrat chromogène spécifique de la thrombine (CS-01(81)), qui libère de la paranitroaniline (pNA). La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est inversement proportionnelle à la concentration de DTI contenu dans l'échantillon.

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

REACTIFS:

[R1] **Substrat chromogène spécifique de la thrombine (CS-01(81))**, lyophilisé en présence de stabilisants, d'un agent neutralisant l'héparine, et d'un agent inhibiteur de la polymérisation de la fibrine.

[R2] **Thrombine humaine**, purifiée, lyophilisée en présence de stabilisants. Contient de la BSA.

[R3] **Tampon Tris BSA**. Tampon réactionnel Tris NaCl. Prêt à l'emploi. Contient de la BSA et de faibles quantités d'azide de sodium (0.9 g/L).

[R1] [R2] → 2 flacons de 2,5 mL.

[R3] → 2 flacons de 25 mL.

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-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 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.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée.

PRÉPARATION 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 **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 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

[R3] Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application. Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITÉ:

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 :

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

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

[R3] La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 8 semaines à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:

Réactifs:

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Matériel de référence pour dosage de DTI à tester (international ou interne, préparation pharmaceutique...) ou étalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

| Etalons | BIOPHEN™ Dabigatran Plasma Calibrator / Calibrator Low | Plasma Hirudin Standard Low / High | BIOPHEN™ Bivalirudin Calibrator |
|------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Références | 222801 / 222901 | SC020K / SC020L | 226701 |
| Contrôles | BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma / Low | Plasma Hirudin Control | BIOPHEN™ Bivalirudin Control |
| Références | 224701 / 225001 | SC025K | 225701 |

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique.

PRÉLEVEMENTS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS:

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

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-A5⁵ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{5,6}.

PROCÉDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est mesurée à 405nm.

Méthode de dosage (méthode manuelle):

1. Reconstituer les étalons comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans le tampon [R3] comme décrit dans le tableau ci-dessous:

| Etalon | Référence | Dilution en [R3] |
|---------------------------------------|-----------|------------------|
| BIOPHEN™ Dabigatran Plasma Calibrator | 222801 | 1/10 |
| BIOPHEN™ Dabigatran Calibrator Low | 222901 | 1/2 |
| BIOPHEN™ Bivalirudin Calibrator | 226701 | 1/2 |

Pour l'Hirudine, alternativement, un pool de plasma normal supplémenté avec une concentration connue d'Hirudine peut être utilisé. Les étalons doivent être dilués dans le tampon [R3] comme décrit dans le tableau ci-dessous.

| Hirudine gamme basse (SC020K) | 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 |
| Hirudine gamme haute (SC020L) | 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 |

2. Diluer les échantillons et contrôles dans le tampon [R3] comme décrit dans le tableau ci-dessous :

| Echantillons | Référence | Dilution en [R3] |
|------------------------------------|-----------|--------------------------------------------|
| BIOPHEN™ Dabigatran Control Plasma | 224701 | 1/10 |
| BIOPHEN™ Dabigatran Control Low | 225001 | 1/2 |
| Echantillons | NA | 1/10 (gamme standard) 1/2 (gamme basse) |
| Echantillons | Référence | Dilution en [R3] |

| | | | |
|------------------------------|-----------|----------------|-------------|
| BIOPHEN™ Bivalirudin Control | 225701 | 1/2 | |
| Echantillons | NA | 1/2 | |
| Echantillons | Référence | Dilution en R3 | |
| | | Gamme haute | Gamme basse |
| Plasma Hirudin Control | SC025K | 1/25 | 1/10 |
| Echantillons | NA | 1/25 | 1/10 |

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. 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 une microplaque ou un tube plastique incubé à 37°C:

| | Microplaque | Volume |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------|
| Echantillon, contrôle ou étalon dilués. | 50 µL | 200 µL |
| R1 Substrat chromogène spécifique de la thrombine. | 50 µL | 200 µL |
| Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes puis introduire : | | |
| R2 Thrombine humaine. Préincubée à 37°C | 50 µL | 200 µL |
| Mélanger et incubé à 37°C exactement : 2 minutes | | |
| Arrêter la réaction en introduisant : | | |
| Acide citrique (2%)* | 100 µL | 400 µL |
| Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant. | | |

*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui du test : Acide Citrique (2%), R2, R1, échantillon dilué.

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

Faire un blanc plasma si l'échantillon est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

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.

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 (AA405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

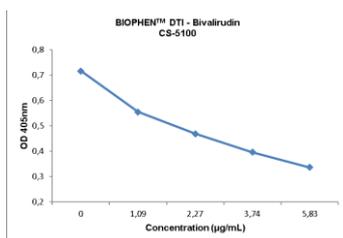
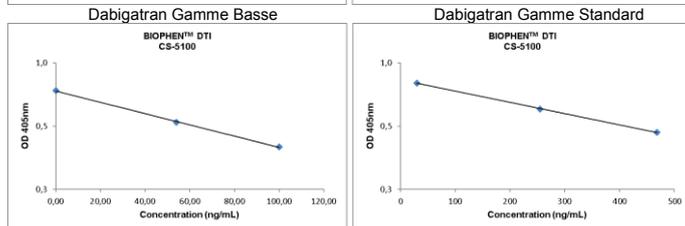
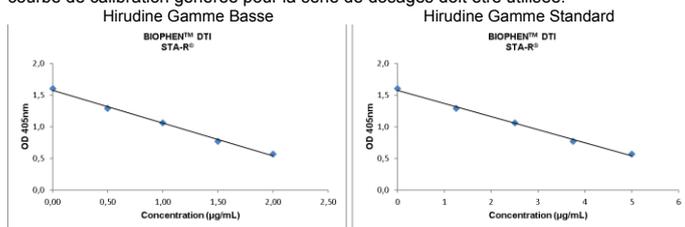
Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ DTI peut être calibré pour le dosage des inhibiteurs directs de la thrombine (DTI) tels que Dabigatran, de l'Hirudine et de la Bivalirudine. L'étalon couvrant la zone de calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- Pour la gamme standard, la zone de calibration va d'environ 0 à 500 ng/mL de Dabigatran.
- Pour la gamme basse, la zone de calibration va d'environ 0 à 110 ng/mL de Dabigatran et d'environ 0 à 2 µg/mL d'Hirudine.
- Pour la gamme haute, la zone de calibration va d'environ 0 à 5 µg/mL d'Hirudine.
- La zone de calibration va d'environ 0 à 5 µg/mL de Bivalirudine.

Les courbes de calibration ci-dessous, sont indiquées à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



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 étalon, en portant en ordonnées la DO à 405nm et en abscisses la concentration d'analyte :
 - **Dabigatran**, utiliser une échelle **Log-Lin** (ng/mL-DO).
 - **Hirudine**, utiliser une échelle **Lin-Lin** (µg/mL-DO).
 - **Bivalirudine**, utiliser une échelle **Lin-Lin** (µg/mL-DO) en polynomiale de degré 3.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration de DTI dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Les résultats sont exprimés, par exemple, en ng/mL de Dabigatran ou µg/mL d'Hirudine et de Bivalirudine.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- 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 présentant un aspect inhabituel ou 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 prédilués dans un pool de plasmas normaux. Les concentrations mesurées doivent alors être multipliées par le facteur de dilution complémentaire.

VALEURS ATTENDUES:

Le Dabigatran, l'Hirudine et la Bivalirudine sont absents des plasmas normaux. 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 de détection dépend du système analytique utilisé.
- La zone de mesure du Dabigatran dépend du système analytique utilisé (environ de 15 à 120 ng/mL (gamme basse) ou 20 à 500 ng/mL (gamme standard) sur STA-R®-series ou CS-series).
- La zone de mesure de l'Hirudine dépend du système analytique utilisé (environ de 0,15 à 2 µg/mL (gamme basse) ou 0,30 à 5 µg/mL (gamme haute) sur STA-R®-series).
- La zone de mesure de Bivalirudine dépend du système analytique utilisé (environ de 0,5 à 15 µg/mL sur Sysmex CS-series avec redilution).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur 1 lot de réactif sur Sysmex CS-series ou STA-R®-series. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire. Les résultats suivants ont été obtenus :

| Echantillons | n | Intra essai | | Inter essais | | |
|---------------------------------|----|-------------|-----|--------------|-------------|------|
| | | Moy. | CV% | N | Moy. | CV% |
| Dabigatran gamme basse niveau 1 | 6 | 28,8 ng/mL | 5,3 | 8 | 23,4 ng/mL | 10,7 |
| Dabigatran gamme basse niveau 2 | 6 | 86,2 ng/mL | 4,1 | 8 | 79,4 ng/mL | 3,0 |
| Dabigatran gamme haute niveau 1 | 6 | 111,2 ng/mL | 1,4 | 6 | 110,8 ng/mL | 7,1 |
| Dabigatran gamme haute niveau 2 | 6 | 280,5 ng/mL | 2,4 | 6 | 281,8 ng/mL | 2,4 |
| Hirudin niveau 1 | 10 | 1,00 µg/mL | 4,8 | 4 | 1,26 µg/mL | <5% |
| Hirudin niveau 2 | 10 | 2,00 µg/mL | 1,5 | 4 | 2,16 µg/mL | <5% |
| Bivalirudine niveau 1 | 40 | 1,62 µg/mL | 0,7 | 10 | 1,64 | 2,4 |
| Bivalirudine niveau 2 | 40 | 3,95 µg/mL | 0,7 | 10 | 4,10 | 2,7 |

- Corrélation avec une autre méthode (BIOPHEN™ DTI vs LC:MS/MS) :
n = 101 y = 0,926x + 10,46 r = 0,987
- Le test est complètement insensible aux héparines (HNF et HBPM) aux concentrations usuelles.
- L'influence des inhibiteurs progressifs de la thrombine peut être négligée en raison des temps d'incubation courts.
- Interférences : se référer au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

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.

SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.