



Manufactured by Hyphen BioMed.

BIOPHEN HEPARIN ON THROMBOLYSER

Adaptation of BIOPHEN HEPARIN ON THROMBOLYSER

1. Reconstitution of the BIOPHEN Heparin 6 reagent, (Reference A221006)

Chromogenic determination of the Anti-Xa activity of LMWH, UFH, and Orgaran.

	NAME	Reconstitution	Stability	Stabilization in T°
R1	SXa-11 Substrate	7.5 ml of distilled water (*)	3 months at 2-8°C ** 7 days at room T° Do not freeze	30 mn <i>on board</i> before any use(***)
R2	Factor Xa	7.5 ml of distilled water (*)	3 months at 2-8°C ** 7 days at room T° Do not freeze	30 mn <i>on board</i> before any use (***)
Diluent	Physiological Saline		24 hours on bord **	Diluent

2. Reconstitution of the BIOPHEN Heparin 3 reagent, (Reference A221003)

Chromogenic determination of the Anti-Xa activity of LMWH, UFH, and Orgaran.

	NAME	Reconstitution	Stability	Stabilization in T°
R1	SXa-11 Substrate	3.75 ml of distilled water (*)	3 months at 2-8°C ** 7 days at room T° Do not freeze	30 mn <i>on board</i> before any use(***)
R2	Factor Xa	3.75 ml of distilled water (*)	3 months at 2-8°C ** 7 days at room T° Do not freeze	30 mn <i>on board</i> before any use (***)
Diluent	Physiological Saline		24 hours on bord **	Diluent

Recommendations for reconstitution:

*** Reconstitution (*):** Reconstitute each vial with distilled water. Shake thoroughly (vortex). Let to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C), while shaking the vial from time to time (vortex), until complete dissolution of the content. Check the absence of any solid at the bottom of the vial.

In current practice, in order to allow a good standardization, reconstitute these two reagents the evening before and put them at 2°-8°C following the 30 minutes at room temperature.

Note: In all cases, before use, check the absence of solids at the bottom of the vial, which confirms that dissolution is complete. If necessary, incubate for 1 hour at RT or better at 37°C, while shaking (vortex) from time to time. If required, then additionally incubate overnight at RT.

Storage of reagents: ()** Stability indicated are validated provided any evaporation or contamination of reconstituted reagents avoided. They must be adjusted according to the actual laboratory working conditions

Take care of putting up the specific caps back on the bottles before storing them at 2°-8° C, and of strictly respecting the temperature stabilization time of 30 minutes before using the reagents on the automate.

If the reagents are kept on the automate board 24H/24H, take care to limit as much as possible any evaporation of the reagents by using a chimney or mini-reducer.

Stabilization of reagents: (*)** It is necessary to let the substrate and the Factor Xa temperature to stabilize for at least 30 minutes on the automate before any use. A too low temperature of the reagents can induce an over-estimation. Conversely a too high temperature leads to an under evaluation of heparin.

Homogenize the reagents before each use.

Any reagent of biological origin must be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

Do not interchange the reagents from different lots.

If necessary use microcups when running the assay, to improve management of the reagents volumes by the automate

3. Determination of Heparins UFH and/or LMWH.

NAME	Reconstitution	Stability	Stabilization in T°
Calibration Biophen Heparin Calibrator (ref A222001)	1 ml of distilled water (*)	7 days at 2-8°C 48 hours at room T°	30 minutes <i>on board</i> before any use (**)
Quality controls Biophen UFH Control (ref A223101) Biophen LMWH Control (ref A223001)	1 ml of distilled water (*)	7 days at 2-8°C 48 hours at room T°	30 minutes <i>on board</i> before any use (**)

4. Determination of Orgaran:

The determination of Orgaran requires its own configuration of the THROMBOLYSER. This one differs from the configuration used for the *determination* of UFH/LMWH only by the denomination of calibrators and controls.

NAME	Reconstitution	Stability	Stabilization in T°
Calibration Biophen Orgaran ® Calibrator (ref A222201)	1 ml of distilled water (*)	7 days at room T° 48 hours at room T°	30 minutes <i>on board</i> before any use (**)
Quality controls Biophen Orgaran ® Control (ref A223501)	1 ml of distilled water (*)	7 days at room T° 48 hours at room T°	30 minutes <i>on board</i> before any use (**)

Reconstitution:

(*) After reconstitution of calibrators or controls with distilled water, let them to stabilize for 30 minutes at room temperature. It is better to reconstitute calibrators the very day of calibration.

Conservation of reagents:

(**) Take care of strictly respecting the 30 minutes temperature stabilization time for *calibrators* and *controls* at room temperature, then the 30 minutes on the automate, particularly if they were stored at + 2°-8°C. Homogenize before each use.

Nota: For lyophilized calibrators and controls, following reconstitution with distilled water, let the reagent to stabilize 30 minutes at room temperature. It is recommended to run the calibration curve with a freshly reconstituted calibrator. It is necessary to let the reagent temperature to stabilize for at least 30 minutes onto the automate before any use. Take care avoiding any contamination or evaporation of the reagents. Stability can be adjusted according to the exact use conditions.

Homogenize before each use.

Do not freeze calibrators and quality control plasmas.

A new calibration curve must be carried out for each new batch of reagents, after each important maintenance of the instrument, or when measured values for controls are out of the acceptance range for the method (after checking all other parameters for the system).

Performances may present slight variations according to the instrument used. Validate the expected values in the laboratory working conditions.

Check the validity of the series by including quality control plasmas at different levels in each one.

Quality controls must be run regularly, and for each new batch of reagents, after an important maintenance of the instrument, or if measured values are not in compliance with the one expected for the method.

5. Results:

- The calibration curve is of the Log (absorbance) - Lin (concentration) type.
- The values obtained for the patients and controls are directly calculated from the calibration curve.
- The results are expressed in IU/ml.
- When Heparin or Orgaran concentrations are out of the working range, assayed plasma must be diluted in normal plasma, appropriately prepared and platelet poor, in order to keep a sufficient concentration of AT III.
- In presence of low AT III concentrations, as it can be the case in young children, an exogenous source of AT III is necessary, in order to correctly measure the heparin concentration.

Nota: Biophen Heparin reagents are developed for measuring homogeneously Unfractionated heparin (UFH) and Low Molecular Weight Heparin (LMWH), using the same calibration curve.

The superimposition conditions are susceptible to slightly vary according to the combination of reagents and lots used, and the technical characteristics and specific adjustment of each apparatus.

Therefore, this superimposition has to be verified and validated in the exact laboratory working conditions and for each machine, by establishing the calibration curve using Biophen Heparin calibrators (LMWH, ref A222001), and by assaying the homogeneous system

of associated Biophen UFH calibrators (ref A222301) , UFH control plasmas (ref A223101), and LMWH control plasmas at high and low levels (ref A223001, A223701).

The linearity (r^2) is expected to be ≥ 0.98 for the calibration curve.

Controls must be measured in compliance.

Measured values for calibrators are acceptable when:

Measured value = target value ± 0.10 IU/ml for levels ≤ 0.50 IU/ml (better ± 0.05 IU/ml)

Measured value = target value ± 0.15 IU/ml for levels > 0.5 IU/ml (better 90-110% of the target value, or ± 0.10 IU/ml for levels between 0.5 and 1.0 IU/ml)

Should the superimposition not be obtained, a separate calibration curve must be used for each type of heparin, and validated by assaying the homogeneous quality control system (controls measured in compliance and close to the assigned target value).

The calibration curve is validated when linearity (r^2), as well as measured control values, are in compliance.

A new calibration curve must be carried out for each new batch of reagents, after each important maintenance of the instrument, or when measured values for controls are out of the acceptance range for the method (after checking all other parameters for the system).

Performances may present slight variations according to the instrument used. Validate the expected values in the laboratory working conditions. Performances, as well as values for each new lot of quality controls used, must then be confirmed (and adjusted if necessary) in the laboratory working conditions.

Nota: The 3 months stability at 2-8°C and the 7 days stability at room temperature (18-25°C) claimed are validated on reconstituted vials kept closed, protected from any evaporation or contamination.

For your information, stability data on STAR board tested in our laboratory working conditions are:

-7 days for reconstituted vials loaded on STAR during working time, using mini reducers or chimneys then closed and stored at 2-8 °C overnight.

-5 days for reconstituted vials left loaded continuously on STAR.

Stabilities of reagents on each automate must be controlled, adjusted and validated under each exact laboratory working conditions.

Programming the Thrombolyser analyzer

- Click on the icon **set up software** for the **manager program** and create the program according to :

Parameters : BIOPHEN HEP	
Reagent	: BIOPHEN HEP
Lot Number	:
Volume (ml)	: XX
Date	:
Unit	: UI/ml
Double acceptance	: Yes
	: 10%
Incubation	: 80
Read 1	: 40
Read 2	: 60
Min Simple	: 0.001
Max Simple	: 3.000
Normal Values Min	: 0.010
Normal Values Max	: 2.000
Lag Time	: normal
Algorithme	: Linear Reg
Type of graphic	: LIN/LOG
Val of calib Min	: 0.100 $\delta A/min$
Val of calib Max	: 1.000 $\delta A/min$
Calib dilution	: 0
Following Test	:
Test driv	:
With test dp	: no
Type coag	: C-lin405
Dilut.rpt	: 1
Distribution Time	: 90
Calcul coef	: 1.00

XX For reference A221006 : Volume : 7.5 ml

For reference A221003: Volume : 3.8 ml

REAGENT	CP	UP	Down	Wash	Clean	Wash	Pi-Ty	Inc
SU D	L	95	75	300	0	0	norm	0
BU D	L	35	0	0	0	0	norm	0
PL	L	15	30	250	300	300	Fast	0
RE D	H	95	75	250	300	350	norm	0
Double								
SU D	L	95	75	0	0	0	norm	0
SU D	L	75	75	300	0	0	norm	0
BU D	L	35	0	0	0	0	norm	0
PL	L	15	30	250	300	300	fast	0
BU D	L	35	0	0	0	0	norm	0
PL	L	15	30	250	300	300	fast	0
RE D	H	95	75	250	300	350	norm	0
RE D	H	75	75	250	300	350	norm	0

Détermination chromogénique de l'activité Anti-Xa

des HBPM, des HNF, de l'ORGARAN®

I. RECONSTITUTION DU REACTIF, BIOPHEN HEPARIN 6 (Réf : A221006)

Les deux réactifs, substrat chromogène et Facteur Xa, contenus dans le coffret BIOPHEN Heparin seront utilisés avec la même reconstitution, pour le dosage des HNF/HBPM (cf. chapitre II) et/ou celui de l'Orgaran (cf. chapitre III). En revanche, on utilisera une gamme de calibration et une configuration spécifiques à chaque type d'antithrombotique.

	Nom	Reconstitution	Stabilité**	Stabilisation en T°
R1	SUBSTRAT Sxa - 11	7.5 ml d'eau distillée (*)	3 mois à 2°-8°C 7 jours à T° ambiante ne pas congeler	30 minutes avant toute utilisation (***)
R2	FACTEUR Xa	7.5 ml d'eau distillée (*)	3 mois à 2°-8°C 7 jours à T° ambiante ne pas congeler	30 minutes avant toute utilisation (***)
Diluant	Sérum Physiologique		24 heures à bord	

II. RECONSTITUTION DU REACTIF, BIOPHEN HEPARIN 3 (Réf : A221003)

	Nom	Reconstitution	Stabilité**	Stabilisation en T°
R1	SUBSTRAT Sxa - 11	3.75 ml d'eau distillée (*)	3 mois à 2-8°C 7 jours à T° ambiante ne pas congeler	30 minutes avant toute utilisation (***)
R2	FACTEUR Xa	3.75 ml d'eau distillée (*)	3 mois à 2-8°C 7 jours à T° ambiante ne pas congeler	30 minutes avant toute utilisation (***)
Diluant	Sérum Physiologique		24 heures à bord	

Recommandation pour la reconstitution des réactifs

*Bien agiter lors de la reconstitution (vortex). Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps (vortex), jusqu'à dissolution complète. Vérifier l'absence de dépôt sur le fond du flacon.

En pratique courante, afin de permettre une bonne standardisation, reconstituer ces deux réactifs la veille au soir et les mettre à 2-8°C après les 30 minutes à température ambiante.

Nota : vérifier la dissolution totale du substrat avant toute utilisation (absence de dépôt). Si nécessaire, incuber 1 heure à TA ou mieux à 37°C en agitant régulièrement (vortex), voire laisser stabiliser 1 nuit à température ambiante.

Conservation des réactifs

(**)Les durées de stabilité indiquées sont sous réserve de toute évaporation ou contamination. Elles peuvent être ajustées en fonction des conditions de travail exactes du laboratoire.

- En cas de déchargement tous les soirs des réactifs hors de l'automate, veiller à bien reboucher les flacons avant de les stocker à 2-8°C et de bien respecter le temps de stabilisation de température de 30 minutes ainsi que de bien les agiter avant de les remettre sur l'automate.

- Si le substrat et le Facteur Xa sont gardés 24H/24H à bord de l'automate, veiller à utiliser les cheminées afin d'éviter tout risque d'évaporation.

Stabilisation en température du réactif

(***) Il est impératif de laisser la température du substrat et du Facteur Xa se stabiliser au moins 30 minutes au sein de l'automate avant toute utilisation.

Ne pas interchanger les flacons de réactifs provenant de lots différents de BIOPHEN Heparin.

III. DOSAGE DES HEPARINES HNF ET/OU HBPM

Nom	Reconstitution	Stabilité	Stabilisation en T°
CALIBRATION <u>Biophen Heparin</u> <u>Calibrator(ref A222001)</u>	1 ml d'eau distillée*	7 jours à 2°-8°C 48 heures à T° ambiante	30 minutes à bord avant toute utilisation**
CONTROLES DE QUALITE <u>Biophen HNF Control</u> (ref A223101) <u>Biophen HBPM Control</u> (ref A223001)	1 ml d'eau distillée*	7 jours à 2°-8°C 48 heures à T° ambiante	30 minutes à bord avant toute utilisation**

IV. DOSAGE DE L'ORGARAN

Le dosage de l'Orgaran nécessite sa propre configuration du Thrombolyser Celle-ci, ne diffère de la configuration Héparines HNF/HBPM que par la dénomination des plasmas de calibration ainsi que celle des contrôles de qualité.

Nom	Reconstitution	Stabilité	Stabilisation en T°
CALIBRATION <u>Biophen Orgaran</u> <u>Calibrator (ref A222201)</u>	<u>1 ml d'eau distillée*</u>	7 jours à 2°-8°C 48 heures à T° ambiante	30 minutes à bord avant toute utilisation**
CONTROLES DE QUALITE <u>Biophen Orgaran Control</u> (ref A223501)	<u>1 ml d'eau distillée*</u>	7 jours à 2°-8°C 48 heures à T° ambiante	30 minutes à bord avant toute utilisation**

Reconstitution

(*) Après reconstitution en eau distillée des plasmas de calibration ainsi que des contrôles de qualité, respecter un temps de stabilisation de 30 minutes à température ambiante. Il est préférable de reconstituer les plasmas de calibration le jour de la calibration.

Conservation des réactifs

(**) Veiller à bien respecter le temps de stabilisation des calibrants ainsi que celui des contrôles : 30 minutes à l'intérieur de l'automate et particulièrement s'ils ont été conservés à +2° -8°C. Homogénéiser avant chaque utilisation.

Ne pas congeler les plasma de calibration, ni les contrôles qualité.

Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée à chaque changement de lot du 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.

Chaque laboratoire peut établir son propre domaine d'acceptation, en fonction des protocoles et des instruments utilisés.

Il est conseillé de passer au moins un contrôle de qualité à divers niveau chaque fois qu'une série de dosages est effectuée.

V. RESULTATS

- La courbe d'étalonnage est du type Log (absorbance) - Lin (concentration).
- Les valeurs des patients et des contrôles sont directement calculées à partir de la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en UI/ml.
- Les redilutions des plasmas échantillons dont les résultats sont hors du domaine de mesure de la méthode devront être effectuées en pool de plasmas normaux déplaquettés pour maintenir un taux d'Antithrombine constant.
- Un supplément d'Antithrombine exogène peut être nécessaire pour le dosage chez le jeune enfant.

Nota : Le coffret Biophen Heparin est optimisé pour déterminer de façon homogène les héparines non fractionnées (HNF) ou les héparines de bas poids moléculaire (HBPM), en utilisant une courbe de calibration unique.

Les conditions de superposition sont susceptibles de varier légèrement en fonction de la combinaison des réactifs et lots utilisés, ainsi que des caractéristiques techniques et du réglage spécifique propre à chaque appareil.

Par conséquent, cette superposition doit être vérifiée et validée dans les conditions de travail exactes du laboratoire et pour chaque machine, en établissant la courbe de calibration à l'aide du Biophen Heparin calibrator (LMWH, ref A222001), et en testant le système associé des Biophen UFH calibrator (ref A222301), UFH control plasma (ref A223101), et LMWH control plasma à niveau haut et bas (ref A223001, A223701).

La linéarité (r^2) attendue pour la courbe de calibration est ≥ 0.98 .

Les valeurs mesurées pour les contrôles doivent être conformes.

Les valeurs mesurées pour les calibrateurs sont acceptables lorsque :

Valeur mesurée = valeur cible ± 0.10 UI/ml pour des taux ≤ 0.50 UI/ml (et mieux ± 0.05 UI/ml)

Valeur mesurée = valeur cible ± 0.15 UI/ml pour des taux > 0.5 UI/ml (et mieux 90-110% de la valeur cible, ou ± 0.10 UI/ml pour des taux entre 0.5 et 1.0 UI/ml)

Si la superposition ne peut être obtenue, une courbe de calibration spécifique doit être utilisée pour chaque type d'héparine dosée, et validée par la mesure des contrôles de qualité homogènes (valeur conforme, et proche de la cible déterminée).

La gamme d'étalonnage est valide lorsque la linéarité est conforme, et que les contrôles de qualité sont mesurés conformes, dans l'intervalle de confiance défini pour le lot.

Une nouvelle gamme de calibration doit être effectuée à chaque changement de lot de réactif, après chaque maintenance importante de l'analyseur, ou lorsque les contrôles de qualité ne sont pas mesurés dans l'intervalle de confiance défini, après vérification des paramètres du test.

Nota : Les performances du test peuvent varier légèrement selon l'instrument utilisé. Vérifier les zones attendues pour les lots de réactifs et l'instrument utilisé dans les conditions de travail du laboratoire. Ces performances, ainsi que les valeurs attendues, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé, doivent, par conséquent, être confirmées (et ajustées si nécessaire), dans les conditions de travail exactes du laboratoire.

Nota : Les stabilités 3 mois à 2-8 °C et 7 jours à TA ont été obtenues sur des flacons reconstitués, conservés fermés, exempts de tout risque d'évaporation.

A titre d'information, nous vous fournissons les données de stabilité déterminées par notre laboratoire à bord de l'automate STA-R :

-1. Les flacons reconstitués laissés à bord de l'automate STA-R toute la journée avec des cheminées, puis fermés et stockés à 2-8 °C le soir, sont stables 7 jours ;

-2. Les flacons reconstitués laissés à bord de l'automate STA-R en continue sont stables 5 jours

Chaque laboratoire doit contrôler, ajuster et valider selon ses conditions exactes de travail, la stabilité à bord de chaque automate.

• PROGRAMMATION DE L'ANALYSEUR

Configurer les tests

Afin de créer un nouveau test, sélectionner un emplacement libre et entrer la configuration suivante pour le dosage des héparines HNF/HBPM. Il est à noter que la configuration pour le dosage de l'Orgaran est similaire hormis la dénomination des contrôles et des plasmas de calibration.

Paramètres : BIOPHEN HEP	
Réactif	: BIOPHEN HEP (***)
N° de lot	:
Volume (ml)	: (*)
Date	:

Unit	: UI/ml
Double	: Yes
Tolérance	: 10%
Incubation	: 80
Lecture 1	: 40
Lecture 2	: 60
Min Simple	: 0.001
Max Simple	: 3.000
Valeurs Normales Min	: 0.010
Valeurs Normales Max	: 2.000
Temps d'attente	: normal
Algorithme	: Reg.Linear
Type graphique	: LIN/LOG
Val de calib Min	: 0.100 $\delta A/min$
Val de calib Max	: 1.000 $\delta A/min$
Calib dilution	: 0
Test suivant	:
Test driv	:
Avec test dp	: no
Type coag	: C-lin405
Dilut.rpt	: 1
Temps de distribution	: 90
Facteur de calcul	: 1.00

Pour référence 221006 renseigner les volumes suivants : (*) = 7.5 ml

Pour référence 221003 renseigner les volumes suivants : (*) = 3.8 ml

()* les réactifs doivent être bien homogénéisés avant chaque utilisation**

REAGENT	CP	UP	Down	Wash	Clean	Wash	Pi-Ty	Inc
SU D	L	95	75	300	0	0	norm	0
BU D	L	35	0	0	0	0	norm	0
PL	L	15	30	250	300	300	Fast	0
RE D	H	95	75	250	300	350	norm	0
Double								
SU D	L	95	75	0	0	0	norm	0
SU D	L	75	75	300	0	0	norm	0
BU D	L	35	0	0	0	0	norm	0
PL	L	15	30	250	300	300	fast	0
BU D	L	35	0	0	0	0	norm	0
PL	L	15	30	250	300	300	fast	0
RE D	H	95	75	250	300	350	norm	0
RE D	H	75	75	250	300	350	norm	0