



Manufactured by Hyphen BioMed.

BIOPHEN HEPARIN LRT ON SYSMEX CA 1500

1. Preparation of BIOPHEN Heparin (LRT) reagent, (Reference A221011)

Both reagents, chromogenic substrate SXa-11 and Factor Xa, included in Biophen Heparin LRT kit, are ready to use, for the assay of UFH/LMWH (see chapter II) or Orgaran® (see chapter III). A calibration curve and a specific configuration will be use for each type of antithrombotic substance.

R1 : SXa-11 Substrate (liquid, ready to use).
R2: Factor Xa (liquid, ready to use).
Diluent (not provided): physiological saline.

- **Recommendation for stabilization of the reagents:**

Before use, let the reagents to stabilize for 30 minutes at room temperature (18-25°C), while shaking from time to time.

It is necessary to let the reagent temperature to stabilize for at least 30 minutes on the automate board before any use.

- **Stability data indicated on the insert are validated on vials kept closed, and provided any evaporation or contamination of reagents is avoided. They must be verified and adjusted if required according to the actual laboratory working conditions**

Storage of reagents: Take care of putting up the specific caps back on the bottles before storing them at 2°-8° C, and of well homogenising and 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, take care and use reducers to limit as much as possible any evaporation of the reagents.

- **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.**

2. 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 on board SYSMEX CA 1500 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 on board SYSMEX CA 1500 before any use (**)

3. Determination of Orgaran:

The determination of Orgaran requires its own configuration of the CA 1500. 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 on board SYSMEX CA 1500 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 on board SYSMEX CA 1500 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.

Foot-note: Do not freeze calibrators or controls.

Foot-note: A calibration curve must be carried out for each new batch of reagents.

4. 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.

5. Instrument setting for sysmex CA 1500:

Click on the window Set up software for the “manager program” and create the program according to: Chromogen for AT3

Change the data with the data indicated on the table below

Use the program and create the name for the reagents, Calibration plasmas and control plasmas

System		Ready		
Parameter : HEP LRT Chr Para Code				
Sample.Vol			18	µl
Diluent Vol	Dist Water		36	µl
Wash	Without			
Second Dilution	No	0µl		
Diluent Vol	No	0µl		
Wash	Without			
Deficient Plasma	No			
Wash	Without	x0/	Without	x0
First reagent	SUB	90µl	20 sec	
Diluent Vol	No	0µl		
Wash	Without	x0/	Clean I x 1	
Second reagent	Xa	90µl	250 sec	Norm
Diluent Vol	No	0µl		
Wash	Without	x0/ Off / CleanI x 1		
Third reagent	Without			
Diluent Vol	No Util	0µl		
Wash	Without	x0/	Without x0	
Detector	Chromogenic for AT III			
Sens/wavelength	Low sens /405			
Read time	70 sec			
Select Tests	Name Tests	Special	↑	↓

Detection settings : Analysis range 20 - 50 sec

Calculation parameters : log lin linear regression

I. Préparation du REACTIF BIOPHEN HEPARIN (LRT) (réf : A221011)

Les deux réactifs, substrat chromogène et Facteur Xa, contenus dans le coffret BIOPHEN Heparin LRT seront utilisés, prêts à l'emploi, 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.

R1 : SUBSTRAT SXa - 11 (liquide prêt à l'emploi)
--

R2 : FACTEUR Xa (liquide prêt à l'emploi)

Diluant non fourni : Sérum Physiologique
--

- **Recommandation pour la stabilisation en température des réactifs :**

Avant utilisation, laisser stabiliser les réactifs à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.

Il est impératif de laisser la température des réactifs se stabiliser au moins 30 minutes au sein de l'automate avant toute utilisation

- **Les données de stabilité des réactifs indiquées sur la notice ont été validées sur flacons conservés fermés, et sont indiquées sous réserve de toute évaporation ou contamination. La stabilité peut être ajustée en fonction des conditions de travail exactes du laboratoire.**

Conservation des réactifs : - En cas de déchargement tous les soirs des réactifs hors de l'automate, veiller à bien reboucher les flacons, avec leurs bouchons respectifs, avant de les stocker à 2° - 8°C, et à bien les ré-homogénéiser et respecter le temps de stabilisation en température de 30 minutes quand vous les remettrez sur l'automate.

Si les réactifs sont gardés sur l'automate, prendre soin d'utiliser des cheminées afin de limiter au maximum le risque d'évaporation des réactifs.

- **Bien homogénéiser les réactifs avant chaque utilisation.**
- **Ces réactifs doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits d'origine biologique, potentiellement infectés**
- **Ne pas inter changer les flacons de réactifs provenant de lots différents**

II. 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 du CA 1500 avant toute utilisation**
CONTROLES DE QUALITE <u>Biophen HNF Control</u> <u>(ref A223101)</u> <u>Biophen HBPM Control</u> <u>(ref A223001)</u>	1 ml d'eau distillée*	7 jours à 2° -8° C 48 heures à T° ambiante	30 minutes à bord du CA 1500 avant toute utilisation**

III. DOSAGE DE L'ORGARAN

Le dosage de l'Orgaran nécessite sa propre configuration du CA 1500 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 du CA 1500 avant toute utilisation**
CONTROLES DE QUALITE <u>Biophen Orgaran Control</u> <u>(ref A223501)</u>	<u>1 ml d'eau distillée*</u>	7 jours à 2° -8° C 48 heures à T° ambiante	30 minutes à bord du CA 1500 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.

IV. 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.

V. PROGRAMMATION DE L'ANALYSEUR

Entrer dans le programme de configuration des 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.

3 niveaux de Contrôle de Qualités peuvent être programmés

Systeme				Prêt					
							Urgence		
Protocole d'analyse									
Paramètre : HEP LRT Chr			Para Code						
Vol d'échant.			18	µl					
Vol. diluant	Eau		36	µl					
Vol lavage	Sans								
Seconde dilution	Non Util	0µl							
Vol. diluant	Sans	0µl	7	8	9				
Vol lavage	Sans								
Plasma Déficient	Sans			4	5	6			
Rinçage	Sans	Sans							
Premier réactif	SUB	90µl	20 sec						
Solution d'expulsion	Non	0µl	1	2	3				
Rinçage	Sans	x0	Clean I	x1					
Second réactif	Xa	90µl	250 sec						
Solution d'expulsion		Non	0µl	0	Enter				
Rinçage	Sans	x0/	Clean I	x1					
Troisième réactif	Sans								
Solution d'expulsion	Non	0µl							
Rinçage	Sans	x0	Sans	x0					
Détecteur	Chromogene For AT III								
Sens Long.Onde	Bas sens /405nm		Inc						
Limite d'analyse	70 sec								
Select Tests	Nom Tests	Spécial	↑	↓	Retour				

Détection : Limites d'analyse : 20-50 sec

Paramètres de calcul : log lin linear regression