



Manufactured by Hyphen BioMed.

## BIOPHEN HEPARIN LRT ON SYSMEX CA 7000



### 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.

<b>R1 : SXa-11 Substrate</b> (liquid, ready to use).
<b>R2: Factor Xa</b> (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.

- **Homogeneize 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 (réf A222001)	1 ml of distilled water (*)	7 days at 2-8°C 48 hours at room T° Do not freeze	30 minutes <i>on board</i> before any use (**)
Quality controls Biophen UFH Control (réf A223101) Biophen LMWH Control (réf A223001)	1 ml of distilled water (*)	7 days at 2-8°C 48 hours at room T° Do not freeze	30 minutes <i>on board</i> before any use (**)

## 3. Determination of Orgaran:

The determination of Orgaran requires its own configuration of the CA 7000. 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 (réf 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 (réf 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.**

#### 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.

**Nota:** Biophen Heparin LRT 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  $\geq 0.98$  for the calibration curve.

Controls must be measured in compliance.

Measured values for calibrators are acceptable when:

Measured value = target value  $\pm 0.10$  IU/ml for levels  $\leq 0.50$  IU/ml (better  $\pm 0.05$  IU/ml)

Measured value = target value  $\pm 0.15$  IU/ml for levels  $> 0.5$  IU/ml (better 90-110% of the target value, or  $\pm 0.10$  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 stability at 2-8°C and at room temperature (18-25°C) claimed are validated on reconstituted vials kept closed, protected from any evaporation or contamination.

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

## Instrument setting for Sysmex CA 7000

### Create the reagents

Go to Analysis Configuration

Then Reagent information

Create the reagents

**Example of creation for Biophen Heparin LRT reference A221011:**

ID	NAME	LOT	Code Bar	Expir	Limit Init Vol.	Limit Alert	Intern Limit	Vial
1011	Sub HepLRT	00000-1*		00/00*	7.5 ml	1.02		GW5
1012	FXa Hep LRT	00000-2*		00/00*	7.5 ml	1.02		GW5
1008	Eau Phy	0		0	5 ml	1.02		GW5
1009	Cal 1....	4000*		00/00*	1 ml	0.2		Cup2

\*user defined

**ID** can be created with 4 numbers.

**Name:** Sub Hep LRT or FXa Hep LRT or eau Phy (NaCl must be in vial of 5 ml as the other reagents).

**Limit Alert:** 1.02 ml for the vial containing 5 ml and more.

**Vial** = GW5 for the vial of 5 ml or more and Cup2 for Standards and controls (vial of 1 ml).

**Go to « Protocol test » and write the following informations:**

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

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

**PROTOCOL FOR 333 TESTS:**

System		Ready		
				Emergency
<b>Analysis protocol</b>				
Parameter : UFHLMWHLRT      Para Code ...				
Sample Vol.			18**	µl
Vol. diluent	NaCl		36**	µl
Washing	Without			Detection method
Second dilution	No	0µl		1
Diluent Vol.	Without	0µl		7
Washing	Without			8
<b>Deficient Plasma</b>	Without	0 µl	0 sec	9
Vol Diluent	No Util.	No	0 µl	4
Washing	Without	x0/Off/Without x0		5
<b>First Reagent</b>	SUBhepLRT 90µl** 12 sec. Norm			6
Diluent Vol	Needle R A2	No	0 µl	1
Washing	Without	x0/	Clean I x 1	2
<b>Second Reagent</b>	XaHepLRT 90µl** 252 sec. Norm			3
Diluent Vol	Needle B1	No	0µl	0
Washing	Without	x0/	Clean I x3	Enter
<b>Third Reagent</b>	Without	0µl	0 sec	
Diluent Vol	No util	No	0µl	
Washing	Without	x0/Off/Without x0		
Detector (*)	Chromogen For AT III			
Wavelength (*)	Bas sens /405nm		Inc	
Detection setting (*)	20 sec		60 sec	
Select Tests	Test Name	Special	↑	↓
				Return

(\*) For CA7000 ⇒ This information is mentioned at the beginning of the table

**PROTOCOL FOR 375 TESTS: (\*\*) 16µl sample Vol, 32 µl Diluent Vol, 80µl SubLRT, 80µl XaLRT**

**Go to « Analysis Configuration »:**

Click on “Calcul Parameter” and complete the following table:

System		Ready analysis	HC GP		
			Emergency		

Choose “Calcul parameter”  
UFHLMWH

Calculus		Parameters	Units	Number	Calc method
○	Para Calc1	UFHLMWH	U/ml	XX.XX	Log-Lin Linear regression
---	Para Calc2 (Ratio)		--	XXX.X	
---	Para Calc3 (INR)		--	XXX.X	ISI
---	Para Calc4		--	XXX.X	Lin-Lin Linear regression

### Détermination chromogénique de l'activité Anti-Xa des HBPM, des HNF, de l'ORGARAN®



#### 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°
<b>CALIBRATION</b> <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**
<b>CONTROLES DE QUALITE</b> <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 avant toute utilisation**

## III. DOSAGE DE L'ORGARAN

Le dosage de l'Orgaran nécessite sa propre configuration du CA7000 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°
<b>CALIBRATION</b> <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**
<b>CONTROLES DE QUALITE</b> <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 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.**

#### 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.

**Nota** : Le coffret Biophen Heparin LRT 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  $\geq 0.98$ .

Les valeurs mesurées pour les contrôles doivent être conformes.

Les valeurs mesurées pour les calibrateurs sont acceptables lorsque :

Valeur mesurée = valeur cible  $\pm 0.10$  UI/ml pour des taux  $\leq 0.50$  IU/ml (et mieux  $\pm 0.05$  IU/ml)

Valeur mesurée = valeur cible  $\pm 0.15$  IU/ml pour des taux  $> 0.5$  IU/ml (et mieux 90-110% de la valeur cible, ou  $\pm 0.10$  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 à 2-8 °C et à TA ont été obtenues sur des flacons reconstitués, conservés fermés, exempts de tout risque d'évaporation ou de contamination.

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

## V. PROGRAMMATION DE L'ANALYSEUR

### Créer les réactifs

Aller dans Configuration Analyse

Puis Info réactif

Créer les réactifs

**Exemple de création pour Biophen Heparin LRT référence 221011:**

ID	NOM	LOT	Barr Code	Expir	Vol Init	Alert Limit	Intern Limit	Flacon
1011	Sub HepLRT	00000-1*		00/00*	7.5 ml	1.02		GW5
1012	FXa HepLRT	00000-2*		11/07	7.5 ml	1.02		GW5
1008	Eau Phy	0		0	5 ml	1.02		GW5
1009	Cal 1....	40000*		11/07	1 ml	0.2		Cup2

**\*défini par l'utilisateur**

ID peut être un code à 4 chiffres.

Nom : Sub hep LRT ou FXa Hep LRT ou eau Phy (NaCl mettre en flacon de 5 ml comme les réactifs).

Alert Limit : 1.02 ml pour les flacons de 5 ml et plus.

Flacon = GW5 pour les flacons de 5 ml ou plus et Cup2 pour les calibrants et les contrôles (flacon de 1 ml).

**Aller en « Protocole test » et remplir le tableau suivant :**

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.

**PROTOCOLE POUR 333 TESTS PAR COFFRET**

Système		Prêt		
				Urgence
<b>Protocole d'analyse</b>				
<b>Paramètre : HNFHBPLRT Para Code ...</b>				
Vol d'échant.		<b>18**</b>	<b>µl</b>	
Vol. diluant	<b>NaCl</b>	<b>36**</b>	<b>µl</b>	Méthode de détection
Vol lavage	Sans			<b>1</b>
Seconde dilution	Non Util	0µl		7
Vol. diluant	Sans	0µl		8
Vol lavage	Sans			9
<b>Plasma Déficient</b>	Sans	0 µl	0 sec Norm	4
Vol Diluant	Non Util.	Non	0 µl	5
Rinçage	Sans	x0/Off/Sans	x0	6
<b>Premier réactif</b>	<b>SUBHepLRT 90(**)µl 12 sec. Norm</b>			1
Vol Diluant	PointeR A2	Non	0 µl	2
Rinçage	Sans x0	Clean I	x 1	3
<b>Second réactif</b>	<b>XahepLRT 90(**)µl 252 sec. Norm</b>			0
Vol Diluant	PointeR B1	Non	0µl	Enter
Rinçage	Sans x0/	Clean I	<b>x3</b>	
<b>Troisième réactif</b>	Sans	0µl	0 sec Norm	
Solution d'expulsion	Non util	Non	0µl	
Rinçage	Sans	x0/Off/Sans	x0	
Détecteur (*)	Chromogène For AT III			
Sens Long.Onde (*)	Bas sens /405nm		Inc	
Limite d'analyse (*)	20 sec		60 sec	
Select Tests	Nom Tests	Spécial	↑	↓
				Retour

(\*) Sur CA7000 ⇒ ces informations sont mentionnées au début du tableau

**PROTOCOLE POUR 375 TESTS : (\*\*) 16µl échant, 32µl diluant, 80 µl Sub, 80µl Xa**

**Aller dans « Configuration d'analyses »:**

Cliquer Paramètre Calcul et remplir le tableau suivant :

System		Analyse prête	HC GP		
			urgence	Capot	

Choix Paramètres Calcul  
HNFHBPM

Calculs		Paramètres	Unité	Nombre	Méthode Calc
○	Para Calc1	HNFHBPM	U/ml	XX.XX	Log-Lin Régression Linéaire
---	Para Calc2 (Ratio)		--	XXX.X	
---	Para Calc3 (INR)		--	XXX.X	ISI
---	Para Calc4		--	XXX.X	Lin-Lin Régression Linéaire