



# HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS ON ACL7000 (research software)

Manufactured By: HYPHEN BioMed

## Assay of Hirudin (and other direct thrombin inhibitors) on ACL7000

### 1. Reconstitution of Hemoclot Thrombin Inhibitors reagents.

- Refer to each specific insert.
- The reagents are equilibrated at room temperature and then gently mixed and equilibrated at 37°C prior to testing.

#### • # ACK002K presentation :

	NAME	Reconstitution	Stability*	T° Stabilization
R1	Normal Pooled Plasma	1 ml of distilled water*	Refer to the insert*	** 30 mn on board before any use
R2	Human Calcium Thrombin	1 ml of distilled water*		

#### • # ACK002L presentation :

	NAME	Reconstitution	Stability*	T° Stabilization
R1	Normal Pooled Plasma	2.5 ml of distilled water*	Refer to the insert*	** 30 mn on board before any use
R2	Human Calcium Thrombin	2.5 ml of distilled water*		

\*The stability data claimed on the insert were obtained on reconstituted vials, kept closed, protected from any contamination or evaporation. Stability must be controlled, and can be adjusted and validated if required, according to the exact use conditions for each laboratory.

**Reconstitution:** (\*) After reconstitution with distilled water, let the reagent to stabilize for 30 minutes at room temperature (18-25°C).

**Stabilization of reagents:** (\*\*) It is necessary to let the reagent temperature to stabilize for at least 30 minutes on the automate board before any use.

**Storage of reagents:** 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, 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. Reagents required but not provided:

- **DILUENT:** Owren Koller buffer (eg AR003A/K) or Physiological Saline buffer (NaCl 9 g/L).

**The same diluent must be used for all the tests performed.**

- **CALIBRATION:** Internal Reference Calibrator titrated for the assayed Thrombin Inhibitor (DTI). Alternatively the following calibrators are available:

**For the assay of Hirudin:**

Plasma Hirudin Standard Low (Ref : ASC020K) using the low range calibration.

OR

Plasma Hirudin Standard High (Ref : ASC020L) using the high range calibration.

**For the assay of Argatroban®:**

Argatroban® Plasma Calibrator (Ref: ASC030K) using the low range calibration.

**For the assay of Dabigatran:**

Dabigatran Plasma Calibrator (Ref: A222801) using the low range calibration.

- **QUALITY CONTROL:** Internal Reference Quality Controls titrated for the assayed Thrombin Inhibitor (DTI). Alternatively the following controls are available:

**For the assay of Hirudin:** Plasma Hirudin Control (Ref : ASC025K)  
(C1 better for low range; C2 better for High range).

**For the assay of Argatroban®:** Argatroban® Control Plasma (Ref: ASC035K)

**For the assay of Dabigatran:** Dabigatran Control Plasma (Ref: A224701)

## 3. Calibrators and Controls:

**Cautions:** Refer to each specific insert for the **reconstitution** volume, the **stability** after reconstitution (indicated provided any contamination or evaporation is avoided. Stability can be adjusted according to the exact use conditions), and the **stabilization before use**.

**Refer to the exact concentrations indicated on the flyer for each lot.**

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 before any use.** Take care avoiding any contamination or evaporation of the reagents. Stability can be adjusted according to the exact use 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.

**Homogenize before each use.**

**Do not freeze calibrators and quality control plasmas.**

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.

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

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

**“LOW RANGE Concentration Curve”:**

- Prepare the appropriate standard curve:
  - From about 0 to 2µg/ml Hirudin (5 levels eg: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 or “C” µg/ml, obtained by mixing appropriate volumes of the two provided “low range” calibrators, #ASC020K, according to the following table:

Hirudin	µg/ml	0	C:4	C:2	3C:4	C
Plasma at “C” (about 2 µg/ml) in µl		0	75	150	225	300
Normal Plasma (about 0µg/ml) in µl		300	225	150	75	0

If required, volumes can be proportionally increased to ensure sufficient volume.

- From about 0 to 2µg/ml Argatroban® (5 levels of ready to use calibrators, #ASC030K)
- From about 0.05 to 0.50 µg/ml Dabigatran (3 levels of ready to use calibrators, #A222801)
- Refer to the exact concentration indicated on the flyer for each lot.
- The standards then have to be assayed at the 1:8 dilution (manual predilution, eg 100µl + 700µl buffer).

**“HIGH RANGE Concentration Curve” (for Hirudin):**

- Prepare a high range standard curve from about 0 to 5 µg/ml Hirudin (5 levels eg: 0, 1.25, 2.50, 3.75, 5.0 or “C” µg/ml, obtained by mixing appropriate volumes of the two provided “high range” calibrators, #ASC020L, according to the following table:

Hirudin	µg/ml	0	C:4	C:2	3C:4	C
Plasma at “C” (about 5 µg/ml) in µl		0	75	150	225	300
Normal Plasma (about 0µg/ml) in µl		300	225	150	75	0

If required, volumes can be proportionally increased to ensure sufficient volume.

- Refer to the exact concentration indicated on the flyer for each lot.
- The standards then have to be assayed at the 1:20 dilution (manual predilution, eg 100µl + 1900µl buffer).

#### 4. Results:

- The calibration curve is of the Lin (Clot time, in seconds), on ordinates - Lin ( $\mu\text{g/ml}$  assayed DTI) type (on abscissae).
- The values obtained for patients and controls are directly calculated from the calibration curve (when the standard dilution is used for the test).
- The results are expressed as  $\mu\text{g/ml}$  of assayed DTI.

The calibration curve is validated when linearity ( $r^2 \geq 0.98$ ), as well as measured control values (at least one in each series, better two levels), are in compliance.

A new calibration curve must be carried out better with each test series, and at least 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).

Clotting times and performances may present variations according to the assayed DTI, the instrument used, and to the clot detection sensitivity adjustment. Validate the expected values in the exact laboratory working conditions. Performances, as well as expected ranges, and values for each new lot of quality controls used, must then be confirmed (and adjusted if necessary) for each specific application in the exact laboratory working conditions and for the specific application.

#### 5. Programming the Analyser

##### A. USUAL LOW RANGE

Calibrators, controls and plasmas are tested at the **1:8 dilution** in physiological saline or Owren Koller type buffer. (**Manual predilution**)

##### B. HIGH RANGE FOR HIRUDIN

Calibrators, controls and plasmas are tested at the **1:20 dilution** in physiological saline or Owren Koller type buffer. (**Manual predilution**)

**C. Protocol:**

**Reagents are preheated at 37°C.**

PHASE	CONDITION	OPERATION	PARAMETERS
1 <sup>st</sup> loading step	YES	Reagent loading (pos 18)	0µl
		Washing after reagent loading (pos 18)	0
		Diluent (pos DIL)	0
		<b>Specimen (prediluted 1 :8 or 1 :20)</b>	<b>50µl</b>
		<b>Reagent (nacelle 2) R1 (Normal plasma)</b>	<b>100µL</b>
		Washing between specimen	2
		Optical ref. (cycle abs.) Diluent (pos DIL) Reagent (nacelle 2)	0 0
		Washing (at the end of loading)	0
		Incubation time (T1)	0
2 <sup>nd</sup> loading step	YES	Diluent (pos DIL)	0µL
		Specimen	0µL
		Washing between specimen	0
		<b>Reagent (nacelle 3) R2 (Thrombin)</b>	<b>100µL</b>
		Washing after reagent loading	2
		Mix time (T2)	60 s
		Activation time (T3)	0 s
3 <sup>rd</sup> loading step	NO	Reagent (pos 17)	0µL
		Washing after reagent loading	0
		Mix time (T4)	0 s
		Activation time (T5)	0 s
Washing	NO	Reagent (pos 1)	0µL
		Reagent (pos 16)	0µL
		Cycles number	1
		Washing at the end of loading	1
Levels detection	NO		
Acquisition parameters	YES	Ramp	yes
		Inter-ramp interval (T6)	3s
		Delay before acquisition (T7)	<b>0</b>
		Acquisition time (T8)	<b>180s</b>
		Canal used	660nm
Rotation speed	1200 rpm		

-----

**Low range (working dilution 1 :8) : Example of calibration curves**

$\mu\text{g/ml}$ Hirudin (Lepirudin)	CT (sec)
0	30
0.5	40,2
1.0	54,6
1.5	73,8
2.0	94,2
$r^2$ (lin-lin)	>0.98

$\mu\text{g/ml}$ Argatroban®	CT (sec)
0	32.7
0.59	48.2
1.11	62.0
1.56	77.0
1.97	86.4
$r^2$ (lin-lin)	0.997

**High range (working dilution 1 :20) : Example of calibration curves**

$\mu\text{g/ml}$ Hirudin (Lepirudin)	CT(sec)
0	32,0
1.25	40,7
2.50	55,5
3.75	73,8
5.0	92,4
$r^2$ (lin-lin)	>0.98



Fabricant: HYPHEN BioMed

# HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS sur ACL7000 (logiciel recherche) (Ref. #ACK002K/ACK002L)

Détermination chronométrique de la concentration en HIRUDINE (ou autres DTIs)

## 1. RECONSTITUTION DU REACTIF, HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS

Se référer à chaque notice spécifique.

Les réactifs sont équilibrés à température ambiante, homogénéisés, puis équilibrés à 37°C avant de réaliser le dosage.

### • # ACK002K :

	Nom	Reconstitution	Stabilité(*)	Stabilisation en T°
R1	Normal Plasma Pool	1 ml d'eau distillée (*)	Refer notice	30 mn à bord de l'automate avant toute utilisation (**)
R2	Thrombine Calcique humaine	1 ml d'eau distillée (*)		

### • # ACK002L :

	Nom	Reconstitution	Stabilité(*)	Stabilisation en T°
R1	Normal Plasma Pool	2,5 ml d'eau distillée (*)	Refer notice	30 mn à bord de l'automate avant toute utilisation (**)
R2	Thrombine Calcique humaine	2,5 ml d'eau distillée (*)		

**\*La stabilité indiquée sur la notice a été obtenue sur flacons reconstitués, conservés fermés, donc exempts et sous réserve de toute évaporation ou contamination. La stabilité doit être contrôlée, et ajustée et validée si nécessaire en fonction des conditions de travail exactes de chaque laboratoire.**

**\* Reconstitution :** (\*) Après reconstitution en eau distillée, respecter un temps de stabilisation des réactifs de 30 minutes à température ambiante (18-25°C).

**\* 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 respecter le temps de stabilisation en température de 30 minutes quand vous les remettez 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.

**\* Stabilisation en température des réactifs :** (\*\*) Il est impératif de laisser la température se stabiliser au moins 30 minutes au sein de l'automate avant toute utilisation.

**\* 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.**

## 2. REACTIFS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS:

- **DILUANT:** Tampon type Owren Koller (ex AAR003A/K) ou Serum Physiologique (NaCl 9 g/L).

**Le même diluant doit être utilisé pour tous les tests réalisés.**

- **CALIBRATION:** Calibrateur de Référence Interne titré pour l'Inhibiteur de Thrombine à doser (DTI). Alternativement, les calibrateurs suivants sont disponibles :

**Pour test de l'Hirudine:**

Plasma Hirudin Standard Low (Ref : ASC020K) en utilisant la calibration Gamme Basse.

OU

Plasma Hirudin Standard High (Ref : ASC020L) en utilisant la calibration Gamme Haute.

**Pour test de l'Argatroban®:**

Argatroban® Plasma Calibrator (Ref: ASC030K) en utilisant la calibration Gamme Basse.

**Pour test du Dabigatran:**

Dabigatran Plasma Calibrator (Ref: A222801) en utilisant la calibration Gamme Basse.

- **CONTROLE QUALITE:** Contrôle de qualité de référence internes titrés pour l'Inhibiteur de Thrombine à doser (DTI). Alternativement, les contrôles suivants sont disponibles :

**Pour test de l'Hirudine:** Plasma Hirudin Control (Ref : ASC025K)  
(C1 mieux adapté pour gamme basse; C2 mieux adapté pour gamme haute).

**Pour test de l'Argatroban®:** Argatroban® Control Plasma (Ref: ASC035K)

**Pour test du Dabigatran:** Dabigatran Control Plasma (Ref: A224701)

## 3. Calibrateurs et Contrôles :

**Précautions:** Se référer à chaque notice spécifique pour le **volume de reconstitution**, la **stabilité après reconstitution** (indiquée sous réserve de toute contamination ou évaporation. La stabilité peut être ajustée en fonction des conditions de travail exactes), et la **stabilisation avant toute utilisation**.

**Se référer aux concentrations exactes indiquées sur le papillon pour chaque lot.**

**Nota :** Dans le cas d'utilisation de calibrateurs et contrôles lyophilisés, 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**. 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 (avec leurs bouchons respectifs). Veiller à limiter tout risque de contamination ou d'évaporation des réactifs. La stabilité peut être ajustée si nécessaire en fonction des conditions de travail exactes du laboratoire.

**Homogénéiser avant chaque utilisation.**

**Ne pas congeler les plasmas de calibration, ni les contrôles de qualité.**

**Les plasmas de contrôle de qualité doivent être passés régulièrement, et à chaque changement de lot de réactif, après toute maintenance importante de l'analyseur, et lorsque les résultats des Contrôles de Qualité ne sont pas dans les valeurs attendues pour la méthode.**

utilisé. Valider les valeurs attendues dans les conditions de travail exactes du laboratoire.

Il est conseillé de passer au moins un contrôle de qualité à divers niveaux chaque fois qu'une série de dosages est effectuée, afin de la valider.

#### "Calibration GAMME BASSE" (usuelle) :

- Préparer la gamme de standards appropriée:

- D'environ 0 à 2µg/ml Hirudine (5 niveaux ex: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ou "C" µg/ml, obtenus par mélange des volumes appropriés des 2 calibrateurs "gamme basse" fournis, #ASC020K, selon le tableau suivant :

Hirudine	µg/ml	0	C/4	C/2	3C/4	C
Plasma à "C" (environ 2 µg/ml) en µl		0	75	150	225	300
Normal Plasma (environ 0µg/ml) en µl		300	225	150	75	0

Si nécessaire, ces volumes peuvent être augmentés proportionnellement, afin d'avoir un volume suffisant permettant une bonne gestion des volumes par l'automate.

- D'environ 0 à 2µg/ml Argatroban® (5 niveaux de calibrants prêts à l'emploi, #ASC030K)
- D'environ 0.05 à 0.50 µg/ml Dabigatran (3 niveaux de calibrants prêts à l'emploi, #A222801)

- Se référer aux concentrations exactes indiquées sur le papillon pour chaque lot.

- Les calibrants doivent ensuite être testés à la dilution 1/8 (prédilution manuelle, ex. 100µl + 700µl de tampon).

#### "Calibration GAMME HAUTE" (pour l'Hirudine) :

- Préparer la gamme haute d'environ 0 à 5µg/ml Hirudine (5 niveaux ex: 0, 1.25, 2.50, 3.75, 5.0 ou "C" µg/ml, obtenus par mélange des volumes appropriés des 2 calibrateurs "gamme haute" fournis, #ASC020L, selon le tableau suivant :

Hirudine	µg/ml	0	C/4	C/2	3C/4	C
Plasma à "C" (environ 5 µg/ml) en µl		0	75	150	225	300
Normal Plasma (environ 0µg/ml) en µl		300	225	150	75	0

Si nécessaire, ces volumes peuvent être augmentés proportionnellement, afin d'avoir un volume suffisant permettant une bonne gestion des volumes par l'automate.

- Se référer aux concentrations exactes indiquées sur le papillon pour chaque lot.

- Les calibrants doivent ensuite être testés à la dilution 1/20 (prédilution manuelle, ex. 100µl + 1900µl de tampon).

#### 4. Résultats:

- La courbe d'étalonnage est du type Lin (Temps de Coagulation, TC, en secondes) en ordonnée - Lin (concentration du DTI à doser, en µg/ml) en abscisse.
- Si la dilution des contrôles et échantillons à tester est la dilution standard, la concentration en DTI de l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe d'étalonnage.
- Les résultats sont exprimés en µg/ml de DTI.

La gamme d'étalonnage est valide lorsque la linéarité est conforme ( $r^2$

$\geq 0.98$ ), 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 temps obtenus et les performances du test peuvent varier légèrement selon le DTI testé, l'instrument utilisé, le mode de détection du caillot, et selon la sensibilité du réglage de la détection de la formation du caillot. 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.

**NOTE: Pour éviter toute erreur, prendre soin de créer et bien identifier les réactifs appropriés et une procédure spécifique pour chaque DTI et niveau de concentrations testé.**

## 5. PROGRAMMATION DE L'AUTOMATE

### **A. GAMME BASSE (USUELLE)**

Les calibrants, contrôles et plasmas sont testés à la **dilution 1/8** en sérum physiologique ou tampon type Owren Koller (**Predilution manuelle**)

### **B. GAMME HAUTE POUR L'HIRUDINE**

Les calibrants, contrôles et plasmas sont testés à la **dilution 1/20** en sérum physiologique ou tampon type Owren Koller (**Predilution manuelle**)

## C. Protocole :

**Les réactifs sont préchauffés à 37°C.**

PHASE	CONDITION	OPERATION	PARAMETRES
1ere étape de chargement	OUI	Chargement réactif (pos 18)	0µl
		Cycle nettoyage après réactif (pos 18)	0
		<b>Diluant (pos DIL)</b>	<b>0</b>
		<b>Specimen (prédilué au 1/8 ou 1/20)</b>	<b>50µl</b>
		<b>Réactif (nacelle 2) R1 (Normal Plasma)</b>	<b>100µL</b>
		Nettoyage entre specimens	2
		Ref Optique (cycle abs.)	
		Diluant (pos DIL)	0
		Réactif (nacelle 2)	0
		Nettoyage (fin de chargement)	0
		Temps d'Incubation (T1)	0
2eme étape de chargement	OUI	Diluant (pos DIL)	0µL
		Specimen	0µL
		Lavage entre specimen	0
		<b>Réactif (nacelle 3) R2 (Thrombin)</b>	<b>100µL</b>
		Nettoyage (fin de chargement)	2
		Temps de mélange (T2)	60 s
		Temps d'Activation (T3)	0 s
3eme étape de chargement	NON	Réactif (pos 17)	0µL
		Nettoyage (fin de chargement)	0
		Temps de mélange (T4)	0 s
		Temps d'activation (T5)	0 s
Lavage	NON	Réactif (pos 1)	0µL
		Réactif (pos 16)	0µL
		Nombre de Cycles	1
		Nettoyage (fin de chargement)	1
Détection niveaux	NON		
Paramètres d'Acquisition	OUI	Rampe	yes
		Intervalle Inter-rampe (T6)	3s
		Délai avant acquisition (T7)	<b>0</b>
		Temps d'Acquisition (T8)	<b>180s</b>
		Canal utilisé	660nm
		Vitesse de Rotation	1200 rpm

-----

**EXEMPLE DE CALIBRATIONS OBTENUES:**

**Gamme Basse usuelle (dilution de travail au 1/8):**

Hirudine (Lepirudine) : µg/ml	CT (sec)
0	30,0
0.5	40,2
1.0	54,6
1.5	73,8
2.0	94,2
r <sup>2</sup> (lin-lin)	>0.98

Argatroban® : µg/ml	CT (sec)
0	32.7
0.59	48.2
1.11	62.0
1.56	77.0
1.97	86.4
r <sup>2</sup> (lin-lin)	0.997

**Gamme Haute pour Hirudine (dilution de travail au 1/20):**

Hirudine (Lepirudine) : µg/ml	CT (sec)
0	32,0
1.25	40,7
2.50	55,5
3.75	73,8
5.0	92,4
r <sup>2</sup> (lin-lin)	>0.98