



HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS ON STA-R

Assay of Hirudin

(and other direct thrombin inhibitors) on STAR

Proposal 1



1. Reconstitution of Hemoclot Thrombin Inhibitors reagents

- # 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 AAR003A/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 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. 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 for a good management by the STAR.

- 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 (which is directly managed by the automate).

“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 for a good management by the STAR.

- Refer to the exact concentration indicated on the flyer for each lot.
- The standards then have to be assayed at the 1:20 dilution (which is directly managed by the automate).

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.

NOTE: To avoid any confusion, take care to create and identify appropriate reagents and specific procedure for each assayed DTI and concentration range.

5. Programming the Analyser for the LOW RANGE:

This allows measuring concentrations in the range of about 0.1 to 2µg/ml Hirudin or Argatroban®, or from 0.05 to 0.50 µg/ml Dabigatran.

All calibrators, controls and patient plasma are loaded “pure” (undiluted); the 1:8 dilution being directly managed by the the automate.

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

TESTS				Configuration				
Method								
IDENTIFICATION								
Abbreviation			TI LOW		Last up date			
Name		TI LOW			Method		CLOT-BASED	
SAMPLE				DILUENT				
Vol. µl	Incu.	Dilution	Id.	Name		Stab. h	Min Vol	
50 µl	0 sec	1/8	11361	OWREN KOLLER		(*)	0.9	
REAGENTS								
	Id.	Nom		Stab. h	Vol. µl	Incu. sec	Prec.	Continued
Ra	HR1	R1 HIR		(*)	100	240		
Rb								
Rc								
Rd	HR2	R2 HIR		(*)	100			

* To be filled by the user, according to the instructions of the insert, and to the exact use conditions.

Enter data concerning washing

	Id.	Name	Stab. H	Vol. µl	Incu. Sec	Prec.	Vial. MI	Min Vol
Diluent	11361	OWREN-KOLLER	*				*	*
Ra	HR1	R1 HIR	*	100	240		**	**
Rb								
Rc								
Rd	HR2	R2 HIR	*	100			**	**

Washing				
	Ra	Rb	Rc	Rd
Before	No			No
After	Intensive			Special
Wash				12227
Name				STA-DESORB.U
Stab. H				120
Vial ml				12
Vol in. ml				0.9

* To be filled by the user, according to the instructions of the insert, and to the exact use conditions.

** vial of 1 ml and min volume 0.2ml for ACK002K
OR eg vial of 3 ml and min volume of 0.5ml for ACK002L

Click on the icon **Result software** for the **manager program** and create the program according to:

TESTS		Configuration							
I. Result									
METHOD CLOT-BASED		RESULT							
Min. Time	10	Primary Units .	µg/ml						
Max Time	200	Corrector	1.00						
Mean Time	40	Single/Duplicate							
Clot	<input checked="" type="radio"/> Normal <input type="radio"/> weak <input type="radio"/> Mean	<input checked="" type="radio"/> Single* <input type="radio"/> Duplicate							
<input checked="" type="checkbox"/> Rd Heating <input checked="" type="checkbox"/> Stirring		Precision (%)	5.00						
		Redilution	Condition						
		1/	<						
		1/	>						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Validation</th> </tr> <tr> <th>Min.</th> <th>Max.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0*</td> <td>2.0*</td> </tr> </tbody> </table>		Validation		Min.	Max.	0*	2.0*
Validation									
Min.	Max.								
0*	2.0*								

*to be adjusted by the user (eg 0-2 for Hirudin or Argatroban®, or 0.05-0.5 for dabigatran).
Test in duplicate is recommended.

Write calibration data.

TESTS						Configuration
		II. Calibration				
MODE :		Linear		Determination		
				<input checked="" type="checkbox"/> Duplicate <input type="checkbox"/> Single		
ASSAYS			Concentrations			
SCALE: <input checked="" type="checkbox"/> Linear <input type="checkbox"/> Log			<input checked="" type="checkbox"/> Linear <input type="checkbox"/> Inverse <input type="checkbox"/> Log			
	Id.*	Key	Name*	Stab. H	Dilution	
Calibrator 1	DTI1		DTI1	*	1/8	
Calibrator 2	DTI2		DTI2	*	1/8	
Calibrator 3	DTI3		DTI3	*	1/8	
Calibrator 4	DTI4		DTI4	*	1/8	
Calibrator 5	DTI5		DTI5	*	1/8	
Ctrl, Niv. 1						
Ctrl, Niv. 2						

*According to the calibrator used (homogenize before each use). A specific calibrator at appropriate levels must be used for each assayed DTI.

Click on the icon **Printout/Transmission software** for the **manager program** and create the program according to:

TESTS						Configuration	
		III. Printout/Trans.					
PARAMETERS							
	Units	Factor Convers	Print	Transmission Test Number	Usual Values		
					Min.	Max.	
Main	µg/ml		X	0	0*	2 or 0.5*	
Aux1	SEC		X	0			
Aux2							
Aux3							
Printout Limits							
Min.	0	Max.	2.0				

*to be adjusted by the user, according to the assayed DTI and expected values.

Show the last page and enter data concerning the quality control.

TESTS						Configuration	
						Q.C	
LEVEL1							
	Id.	Key	Name	Stab. h	Vial. ml	Min Vol. ml	
	C1*		CONTROL1*	*	1*	0.2*	
LEVEL 2							
	Id.	Key	Name	Stab. h	Vial. ml	Min Vol. ml	
Control	C2*		CONTROL2*	*	1*	0.2*	
LEVEL3							
	Id.	Key	Name	Stab. h	Vial. ml	Min Vol. ml	
Control							
Period : <input type="text"/> hours <input type="text"/> Tests <input type="checkbox"/> Vial							

*According to the controls used (homogenize before each use). Specific controls at appropriate levels must be used for each assayed DTI.

6. Programming the analyzer for the HIGH RANGE FOR HIRUDIN

This calibration allows measuring concentrations in the range of about 2 to 5µg/ml Hirudin.

All calibrators, controls and patient plasma are loaded “pure” (undiluted); the 1:20 dilution being directly managed by the automate.

Create new calibrators, controls and procedure as appropriate, for each assayed DTI.

Test method:

Proceed as for the Low Range but **define the sample dilution at 1/20** (instead of 1/8 previously for the low range).

Results:

Under “Validation”, the **min-max values** are expected between **0-5µg/ml** (or adjusted by the user).

Calibration:

Appropriate **High range calibrators** must be used for the assayed DTI (eg #ASC020L for Hirudin).

Proceed as for the Low Range but **define the dilution at 1/20** (instead of 1/8 previously for the low range).

Printout/Transmission:

Under “Usual values”, the **min-max values** are expected between **2-5µg/ml** for Hirudin (or adjusted by the user).

The **printout limits** are then **0-5** (or adjusted by the user).

Quality Control:

Specific controls at appropriate levels **within the high range** must be used for each assayed DTI (eg #ASC025K for Hirudin).



HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS ON STA-R

Assay of Hirudin
(or other direct Thrombin Inhibitors) activity on STAR

Proposal 2 : VARIANT PROTOCOL

Objective: Appropriate when limited quantity of samples to be assayed is available, or for economical reason to save volume of calibrators/controls. However, this is less recommended in practice as it requires a manual predilution step, which is time consuming and more susceptible to increased variability.

Variant Protocol for the LOW RANGE:

Create new calibrators, controls and procedure when appropriate, for each assayed DTI.

- Preparation of calibrators, controls and samples:**

Proceed as for the Low Range (proposal 1), but **all of them are manually prediluted 1:8** in physiological saline or Owren Koller type buffer (eg 100µl of test point + 700µl buffer), before being loaded on the automate.

Eg . Preparation of the Low range Hirudin concentration calibrators (#ASC020K), according to the following table, in order to get them already 1:8 diluted for the test :

Hirudin	µg/ml	0	C:4	C:2	3C:4	C
Plasma at "C" (about 2 µg/ml) in µl		0	25	50	75	100
Normal Plasma (about 0µg/ml) in µl		100	75	50	25	0
Buffer in µl		700	700	700	700	700

If required, volumes can be proportionally increased to ensure sufficient volume for a good management by the STAR.

- Test method:**

The 1:8 prediluted samples and controls are loaded on the automate. Proceed as for the Low Range (proposal 1) but **define the sample dilution at 1/1** (instead of 1/8 previously for the low range).

- Calibration:**

The 1:8 prediluted calibrators are loaded on the automate. Proceed as for the Low Range (proposal 1) but **define the dilution at 1/1** (instead of 1/8 previously for the low range).



Variant Protocol for the HIGH RANGE FOR HIRUDIN:

Create new calibrators, controls and procedure as appropriate, for each assayed DTI.

- **Preparation of calibrators, controls and samples:**

Proceed as for the HIGH Range (proposal 1), but **all of them are manually prediluted 1:20** in physiological saline or Owren Koller type buffer (eg 100µl of test point + 1900µl buffer), before being loaded on the automate.

Eg . Preparation of the High range Hirudin concentration calibrators (#ASC020L), according to the following table, in order to get them already 1:20 diluted for the test :

Hirudin	µg/ml	0	C:4	C:2	3C:4	C
Plasma at "C" (about 5 µg/ml) in µl		0	25	50	75	100
Normal Plasma (about 0µg/ml) in µl		100	75	50	25	0
Buffer in µl		1900	1900	1900	1900	1900

If required, volumes can be proportionally increased to ensure sufficient volume for a good management by the STAR.

- **Test method:**

The 1:20 prediluted samples and controls are loaded on the automate. Proceed as for the High Range (proposal 1) but **define the sample dilution at 1/1** (instead of 1/20 previously for the high range).

- **Calibration:**

The 1:20 prediluted calibrators are loaded on the automate. Proceed as for the High Range (proposal 1) but **define the dilution at 1/1** (instead of 1/20 previously for the high range).

Additional comment: In case of need of a dependant test:

If the samples and controls are not prediluted, but that the calibration curve is used prediluted manually (respectively at 1:8 for the low range or at 1:20 for the high range), you must create a dependant test using the following instructions:

For the calibration:

	Principal Test
Abbreviation	TI (High or Low)
Name	TI (High or Low)
Dilution	1 :1
Correlation Factor	1.000

For the controls and samples:

	Test Dependent
Abbreviation	TIDep (High or Low)
Name	TIDep (High or Low)
Dilution	1:8 (low range) or 1 :20 (high range)
Correlation Factor	1.000

	Principal	Auxiliary 1	Auxiliary 2	Auxiliary 3
Units	µg/ml	Sec	No	No
Rang Transmission				

EXAMPLE OF OBTAINED CALIBRATION CURVES:

LOW RANGE (working dilution 1:8):

Hirudin (Lepirudin) : $\mu\text{g/ml}$	CT (sec)
0	28.9
0.5	39.9
1.0	55.8
1.5	74.4
2.0	90.7
r^2 (lin-lin)	0.997

Argatroban® : $\mu\text{g/ml}$	CT (sec)
0	28.4
0.59	42.7
1.11	54.6
1.56	64.9
1.97	77.0
r^2 (lin-lin)	0.997

Dabigatran : $\mu\text{g/ml}$	CT (sec)
0.04	36.5
0.25	65.6
0.50	96.8
r^2 (lin-lin)	0.999

HIGH RANGE for Hirudin (working dilution 1:20):

Hirudin (Lepirudin) : $\mu\text{g/ml}$	CT(sec)
0	29.5
1.25	41.8
2.50	59.1
3.75	78.9
5.0	100.8
r^2 (lin-lin)	0.995

Proposition 1

Détermination chronométrique de la concentration en Hirudine et autres Inhibiteurs Directs de la Thrombine (DTI)



1. RECONSTITUTION DU REACTIF, HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS

- **# 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.

Les performances sont susceptibles de varier légèrement en fonction du DTI testé et de l'instrument 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 (directement gérée par l'automate).**

“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 (directement gérée par l'automate).**

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 - GAMME BASSE (USUELLE)

Permet de doser des concentrations d'environ 0.1 à 2µg/ml Hirudine ou Argatroban®, ou d'environ 0.05 à 0.50 µg/ml Dabigatran.

Tous les calibrants, contrôles et plasma à tester sont chargés “purs” (non dilués), et la dilution au 1/8 est directement gérée par l'automate.

Cliquer sur l'icône configuration des tests, (**Echap/configuration/tests**). Afin de créer un nouveau test, sélectionner un emplacement libre et entrer la configuration suivante pour le dosage :

TESTS				Configuration					
Méthodologie									
IDENTIFICATION									
Abréviation		TI Bas		Dernière MAJ.					
Nom	TI Bas			Méthode	Chronométrique				
ECHANTILLON			DILUANT						
Vol. µl	Incu.	Dilution	Id.	Nom	Stab. h	Vol Min			
50 µl	0 sec	1/8	11361	OWREN KOLLER	(*)	0.90			
REACTIFS									
	Id.	Nom	Stab. h	Vol. µl	Incu. sec	Préc.	Suite		
Ra	HR1	R1 HIR	(*)	100	240	<input type="checkbox"/>			
Rb								<input type="checkbox"/>	
Rc								<input type="checkbox"/>	
Rd	HR2	R2 HIR	(*)	100					

(*) A préciser par l'utilisateur en fonction des instructions de la notice, et des conditions exactes de travail.

Cliquer sur l'icône **Suite** afin de rentrer les données concernant les lavages

	Id.	Nom	Stab. H	Vol. µl	Incu. Sec	Préc.	Flac. MI	Vol. Min. MI
Diluant	11361	OWREN-KOLLER	(*)				*	*
Ra	HR1	R1 HIR	(*)	100	240	<input type="checkbox"/>	**	**
Rb								
Rc								
Rd	HR2	R2 HIR	(*)	100			**	**
LAVAGE								
	Ra		Rb		Rc		Rd	
Avant	Non						Non	
Après	Intensif						Spécial	
Nettoyant							12227	
Nom							STA-DESORB.U	
Stab. H							120	
Flacon ml							15	
Vol in. MI							0.9	

(*) A préciser par l'utilisateur en fonction des instructions de la notice, et des conditions exactes de travail.

(**) Flacon de 1 ml et min volume 0.2ml pour ACK002K

OU ex Flacon de 3 ml et min volume 0.5ml pour ACK002L

HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS sur STA-R 5/11

HYPHEN Version 8 - 29 Sept 2010

D.750.06/CK/002/STAR

Cliquer sur l'onglet **Résultat** et rentrer les données suivantes :

TESTS		Configuration	
		Résultat	
ANALYSE CHRONOMETRIE		RESULTAT	
Temps Min.	10	Unité Princ.	µg/ml
Temps-Max	200	Fact. Correction	1.00
Temps-Moy	40	Détermination *	
Caillot	<input checked="" type="radio"/> Normal <input type="radio"/> Faible <input type="radio"/> Moyen	<input checked="" type="radio"/> SIMPLE <input type="radio"/> DOUBLE	
<input checked="" type="checkbox"/> Chauffage Rd <input checked="" type="checkbox"/> Agitation		Ecart/moy. Max (%)	5%
		Redilution	Condition
		1/	<
		1/	>
		ACCEPTATION	
		Min.	Max.
		0.0*	2.0*

*à ajuster par l'utilisateur (ex 0-2 pour Hirudine ou Argatroban®, ou 0.05-0.5 pour dabigatran).
Tester en duplicate est recommandé.

Cliquer sur l'onglet **Calibration** et rentrer les données suivantes :

TESTS		Configuration				
		Calibration				
MODE :		Linéaire	Détermination			
			<input checked="" type="checkbox"/> DOUBLE <input type="checkbox"/> SIMPLE			
Mesures		Concentrations				
ECHELLES :	<input checked="" type="checkbox"/> LINEAIRE <input type="checkbox"/> LOG	<input checked="" type="checkbox"/> LINEAIRE <input type="checkbox"/> INVERSE <input type="checkbox"/> LOG				
	Id.	Clé	Nom	Stab. H	Dilution	Suite
Etalon 1	DTI1		DTI1	(*)	1/8	
Etalon 2	DTI2		DTI2	(*)	1/8	
Etalon 3	DTI3		DTI3	(*)	1/8	
Etalon 4	DTI4		DTI4	(*)	1/8	
Etalon 5	DTI5		DTI5	(*)	1/8	
Ctrl, Niv. 1						
Ctrl, Niv. 2						

*Selon calibrateur utilisé (bien homogénéiser avant utilisation). Un calibrateur spécifique doit être utilisé en fonction du DTI testé.

Cliquer sur l'onglet **Edition/Transmission** et rentrer les données suivantes :

TESTS						Configuration
					Edition/Trans.	
PARAMETRES						
	Unité	Facteur Convers.	Edition	Rang Transmission	Valeurs Usuelles Min. Max.	
Princ.	µg/ml		<input checked="" type="checkbox"/>	0	0.0*	2.0 ou 0.5*
Aux1	Sec		<input checked="" type="checkbox"/>			
Aux2			<input type="checkbox"/>			
Aux3			<input type="checkbox"/>			
LIMITES D'EDITION						
Min.	<input type="text" value="0.0"/>	Max.	<input type="text" value="2.0"/>			

(*) à renseigner par l'utilisateur en fonction du DTI dosé et des valeurs attendues.

Cliquer sur l'onglet **Contrôle qualité**.

TESTS						Configuration
					C.Q.	
NIVEAU 1						
	Id.	Clé	Nom	Stab. H	Flac. MI	Vol. Min. MI
Contrôle	C1*		CONTROL1*	*	1*	0.2*
NIVEAU 2						
	Id.	Clé	Nom	Stab. H	Flac. MI	Vol. Min. MI
Contrôle	C2*		CONTROL2*	*	1*	0.2*
NIVEAU 3						
	Id.	Clé	Nom	Stab. H	Flac. MI	Vol. Min. MI
Contrôle						
Période : <input type="text"/> heures <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Tests <input type="checkbox"/> Flacon						

(*) à renseigner par l'utilisateur suivant les contrôles utilisés (bien homogénéiser avant utilisation). Des contrôles de qualité spécifiques, à des niveaux appropriés, doivent être utilisés en fonction du DTI testé.

6. Programmation de l'automate : GAMME HAUTE POUR HIRUDINE

Permet de mesurer des concentrations d'environ 2 à 5µg/ml Hirudine.

Tous les calibrants, contrôles et plasma à tester sont chargés "purs" (non dilués), et la dilution au 1/20 est directement gérée par l'automate.

Créer les nouveaux calibrants, contrôles et procédure appropriés, pour chaque DTI testé.

Test method:

Procéder comme pour la Gamme Basse, mais définir la **dilution de l'échantillon au 1/20** (au lieu de 1/8 précédemment pour la gamme basse).

Résultats:

Sous "Validation", les valeurs **min-max** sont attendues **entre 0-5µg/ml** Hirudine (ou ajustées par l'utilisateur).

Calibration:

Les **calibrateurs Gamme Haute** appropriés doivent être utilisés pour le DTI testé (ex: #ASC020L pour l'Hirudine).

Procéder comme pour la Gamme Basse, mais définir la **dilution au 1/20** (au lieu de 1/8 précédemment pour la gamme basse).

Impression/Transmission:

Sous "Valeurs usuelles", les valeurs **min-max** sont attendues entre **2-5µg/ml** Hirudine (ou ajustées par l'utilisateur).

Les limites d'impression sont alors **0-5** (ou ajustées par l'utilisateur).

Contrôle Qualité:

Des contrôles spécifiques à des niveaux appropriés **au sein de la gamme** doivent être utilisés pour chaque DTI testé (ex : #ASC025K pour Hirudine).

HEMOCLOT THROMBIN INHIBITORS

sur STA-R

PROPOSITION 2 : PROTOCOLE VARIANT

Objectif: Approprié si une quantité limitée de plasma à tester est disponible, ou dans un but d'économie du volume de calibrants et contrôles utilisés. Toutefois, ce protocole variant est moins recommandé en pratique car il nécessite une étape de prédilution manuelle, prenant du temps et susceptible d'induire une plus grande variabilité.

Protocole variant pour GAMME BASSE:

Créer les nouveaux calibrants, contrôles et procédure appropriés, pour chaque DTI testé.

Préparation des calibrants, contrôles et échantillons :

Procéder comme pour la Gamme Basse (proposition 1), mais tous sont **prédilués manuellement au 1/8** en tampon type Owren Koller ou Serum Physiologique (ex : 100µl de point testé + 700µl de tampon), avant d'être chargés sur l'automate.

Ex. Préparation des calibrants Hirudine Gamme Basse (#ASC020K), selon le tableau suivant, afin de les obtenir déjà dilués au 1/8 pour le test:

Hirudine	µg/ml	0	C/4	C/2	3C/4	C
Plasma à "C" (environ 2 µg/ml) en µl		0	25	50	75	100
Normal Plasma (environ 0µg/ml) en µl		100	75	50	25	0
Tampon en µl		700	700	700	700	700

Si nécessaire, les volumes peuvent être augmentés proportionnellement afin d'obtenir un volume suffisant pour une bonne gestion par l'automate.

Test method:

Les échantillons et contrôles prédilués au 1/8 sont chargés sur l'automate.

Procéder comme pour la Gamme Basse (proposition 1), mais définir la **dilution de l'échantillon au 1/1** (au lieu de 1/8 précédemment pour la gamme basse).

Calibration:

Les calibrateurs prédilués au 1/8 sont chargés sur l'automate.

Procéder comme pour la Gamme Basse (proposition 1), mais définir la **dilution au 1/1** (au lieu de 1/8 précédemment pour la gamme basse).

Protocole variant pour GAMME HAUTE HIRUDINE :

Créer les nouveaux calibrants, contrôles et procédure appropriés, pour chaque DTI testé.

Préparation des calibrants, contrôles et échantillons :

Procéder comme pour la Gamme Haute (proposition 1), mais tous sont **prédilués manuellement au 1/20** en tampon type Owren Koller ou Sérum Physiologique (ex : 100µl de point testé + 1900µl de tampon), avant d'être chargés sur l'automate.

Ex . Préparation des calibrants Hirudine Gamme Haute (**#ASC020L**), selon le tableau suivant, afin de les obtenir déjà dilués au 1/20 pour le test:

Hirudine	µg/ml	0	C/4	C/2	3C/4	C
Plasma à "C" (environ 5 µg/ml) en µl		0	25	50	75	100
Normal Plasma (environ 0µg/ml) en µl		100	75	50	25	0
Tampon en µl		1900	1900	1900	1900	1900

Si nécessaire, les volumes peuvent être augmentés proportionnellement afin d'obtenir un volume suffisant pour une bonne gestion par l'automate.

Test method:

Les échantillons et contrôles prédilués au 1/20 sont chargés sur l'automate.

Procéder comme pour la Gamme Haute (proposition 1), mais définir la **dilution de l'échantillon au 1/1** (au lieu de 1/20 précédemment pour la gamme haute).

Calibration:

Les **calibrateurs Gamme Haute** appropriés doivent être utilisés pour le DTI testé (ex: **#ASC020L** pour l'Hirudine).

Procéder comme pour la Gamme Haute (proposition 1), mais définir la **dilution de l'échantillon au 1/1** (au lieu de 1/20 précédemment pour la gamme haute).

Information complémentaire si un test dépendant était nécessaire:

Si les échantillons et contrôles ne sont pas prédilués, mais que les calibrateurs sont utilisés prédilués manuellement (respectivement au 1/8 pour la gamme basse ou au 1/20 pour la gamme haute), il faut créer un test dépendant selon les instructions suivantes:

Pour la calibration:

	Test Principal
Abbréviation	TI (Haut ou Bas)
Nom	TI (Haut ou Bas)
Dilution	1 :1
Correlation Factor	1.000

Pour les échantillons et contrôles:

	Test Dependant
Abbréviation	TIDep (Haut ou Bas)
Nom	TIDep (Haut ou Bas)
Dilution	1:8 (gamme basse) ou 1 :20 (gamme haute)
Correlation Factor	1.000

	Principal	Auxiliaire 1	Auxiliaire 2	Auxiliaire 3
Unités	µg/ml	Sec	No	No
Transmission				

EXEMPLE DE CALIBRATIONS OBTENUES:

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

Hirudine (Lepirudine) : µg/ml	TC (sec)
0	28.9
0.5	39.9
1.0	55.8
1.5	74.4
2.0	90.7
r ² (lin-lin)	0.997

Argatroban® : µg/ml	TC (sec)
0	28.4
0.59	42.7
1.11	54.6
1.56	64.9
1.97	77.0
r ² (lin-lin)	0.997

Dabigatran : µg/ml	TC (sec)
0.04	36.5
0.25	65.6
0.50	96.8
r ² (lin-lin)	0.999

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

Hirudine (Lepirudine) : µg/ml	TC (sec)
0	29.5
1.25	41.8
2.50	59.1
3.75	78.9
5.0	100.8
r ² (lin-lin)	0.995