

Adaptation of BIOPHEN HEMOCLOT V-L on STA

**1. Reconstitution of BIOPHEN HEMOCLOT V-L (Ref ACK061K) reagent.
(Ref ACK061L)**

Determination of factor V-Leiden. activity with a clotting method

NAME	Reconstitution	Stability	Stabilization at the room Temperature
R1	4ml distilled water (*)	8 hours at room T° 24hours at 2-8 °C 1 month at -20°C	30 mn before any use (**)
R2A	1ml distilled water (*)	8 hours at room T° 24hours at 2-8 °C 1 month at -20°C	30 mn before any use (**)
R2B	1ml distilled water (*)	8 hours at room T° 24hours at 2-8 °C 1 month at -20°C	30 mn before any use (**)
R3	4 ml Distilled water (*)	8 hours at room T° 24hours at 2-8 °C 1 month at -20°C	30 mn before any use (**)

Reconstitution:

(*) Following reconstitution with distilled water, let the reagents to stabilize for 30 minutes at room temperature.

Conservation 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.

Stabilization of reagents:

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

2. Determination of Factor V-Leiden activity

NAME	Reconstitution	Stability	Stabilization in T°
Quality controls Biophen Normal Control (ref A223201)	1 ml of distilled water (*)	24 hours at 2-8°C 8 hours at room T° Do not freeze	30 minutes <i>on STA board</i> before any use (**)
Biophen ACT PCr Control. (ref A223405)	0.5 ml of distilled water (*)	24 hours at 2-8°C 8 hours at room T° Do not freeze	30 minutes <i>on STA board</i> before any use (**)

Reconstitution:

(*) Following reconstitution controls with distilled water, let them to stabilize for 30 minutes at room temperature.

Conservation of reagents:

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

Foot-note: Do not freeze controls.

3. Results:

- The clotting times obtained for patients plasmas and controls with (CT2) or without (CT1) APC, are expressed in seconds, for each patient, the ratio CT2/CT1 between both clotting times must be calculated.
- The ratio of the Clotting Times obtained with or without APC, CT2/CT1, allows measuring the sensitivity of Factor V, in the tested specimen, to the action of Activated Protein C.
- Normal plasma, containing normal Factor V, is sensitive to this action, and yields a ratio: $CT2/CT1 \geq 2.00$
- Plasmas from patients carrying the R506Q mutation of Factor V, i.e. containing Factor V Leiden, yield a ratio: $CT2/CT1 \leq 1.80$.
- Molecular biology allows confirming the diagnosis, and classifying patients as heterozygous or homozygous.

NOTA: For a same reagent lot and a same tested specimen, CT1 and CT2 may present variations according to the instrument used, and to the clot detection sensitivity adjustment. This might affect the CT2/CT1 ratio. Always validate the cut-off values used for normals and for patients carrying the Factor V mutation, and, if necessary, adjust them.

4. Programming of the STA. and STA C analyzer:

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

A. Create the program for V-L2 (With Activated Prot C (APC))

CONFIGURATION – Page 1 / 3

Identification										
Abbreviation		Name			Method			Date		
VL2		HEMO VL2			CLOT-BASED					
Sample				Diluent						
Volume	Incu	Dil.	Id.	Name			Vial.	stab	Min Vol	
50µl	0 sec	1/10	11361	OWREN KOLLER			15 ml	72h	0.9 ml	
Reagents										
Id.		Name		Incu sec	Vol. µl	Vial ml	Stab h	Min Vol ml	Washing	
Ra R1		R1 HEM VL		0	50	4	8	0.2	Before	after
Rb R2B		R2B HEM VL		120	25	1	8	0.2	no	Special
Rc										
Rd R3		R3 HEM VL			50	4	8	0.2	no	Intensive
Analysis			Result				Validation (sec)			
Min time		40 sec	Primary Units		sec		Standard	min		max
Maxi time		250 sec	Corrector		1.00			10		250
Mean time		70 sec	Single/Duplicate		single					
Rd Heating		Yes	Precision		5%					
Stirring		Yes	Redil. Condition		sec					
Clot type		normal	<							
			>							

Enter data concerning washing.

Washing				
	Ra	Rb	Rc	Rd
Before	No	no		No
After	Normal	Special		Intensive
Wash		12227		
Name		DESORB U		
Stab. H		15		
Vial ml		120		
Vol in. ml		0.90		

Show the second page and write calibration data.

CONFIGURATION – Page 2 / 3

Control						
	Id.	Key	Name	Vial. ml	Stab. H	Min Vol ml
Level 1						
Level 2						

Go to the last page and enter data concerning the quality control.

Le STA can manage 3 levels of quality control. For example: the following configuration is possible.

CONFIGURATION – Page 3 / 3

Printout / Transmission							
Units	Convers. Factor	Print	Transmission Test number	Usual Values		Sec	
Main	Sec	yes	0	STANDARD	Min.	Max.	
Aux.1					10	250	
Aux.2							
Aux.3							
Printout limits		min	10				
		max	250				
Controls							
	Id.	Key	Name	Period H	Vial. ml	Stab. H	Min Vol ml
Level 1	BNC		B N CONT	24	1	8	0.2
Level 2	VL AB		VL AB CONT	24	1	8	0.2
Level 3							

B. Create the program for V-L1 (without Activator Prot C)

Identification										
Abbreviation		Name			Method			Date		
VL 1		HEMO VL1			CLOT-BASED					
Sample				Diluent						
Volume	Incu	Dil.	Id.	Name			Vial.	stab	Min Vol	
50µl	0 sec	1/10	11361	OWREN KOLLER			15 ml	72h	0.9 ml	
Reagents										
Id.		Name		Incu sec	Vol. µl	Vial ml	Stab h	Min Vol ml	Washing	
Ra R1		R1 HEM VL		0	50	4	8	0.2	Before	after
Rb R2B		R2A HEM VL		120	25	1	8	0.2	no	Normal
Rc									no	Intensive
Rd R3		R3 HEM VL			50	4	8	0.2	no	Intensive
Analysis			Result				Validation (sec)			
Min time		20 sec	Primary Units		sec		Standard	min	max	
Max time		90 sec	Corrector		1.00			20	90	
Mean time		40 sec	Duplicate/single		single					
Rd Heating		Yes	Precision		5%					
Stirring		Yes	Redil. Condition		sec					
Clot type		normal	<							
			>							

Enter data concerning washing.

Washing				
	Ra	Rb	Rc	Rd
Before	No	No		No
After	Normal	Intensive		Intensive
Wash				
Name				
Stab. H				
Vial ml				
Vol in. ml				

Show the second page and write calibration data.

CONFIGURATION – Page 2 / 3

Control						
	Id.	Key	Name	Vial. ml	Stab. H	Min Vol ml
Level 1						
Level 2						

Go to the last page and enter data concerning the quality control.

Le STA can manage 3 levels of quality control. For example: the following configuration it is possible.

CONFIGURATION – Page 3 / 3

Printout / Transmission							
Units	Convers. Factors	Print	Transmission Test number	Usual Values	Sec		
				STANDARD	Min.	Max.	
Main	Sec		yes	0			
Aux.1					10	90	
Aux.2							
Aux.3							
Printout limits		min		10			
		max		90			
Controls							
	Id.	Key	Name	Period H	Vial. ml	Stab. H	Min Vol ml
Level 1	BNC		B N CONT	24	1	8	0.2
Level 2	VL AB		VL AB CONT	24	1	8	0.2
Level 3							

Come back to the program “Test set up” and create a new test. Choose in the window the option “calculated Results”.
 You get the following window,

Identification			
Id	Name	Method	Date
VLRATIO	VLRATIO	calculated Results	
Test		Printout /Transmission	
	Id	Name	Unit Ratio
1	VL2	HEMO VL2	Printout Yes
2	VL1	HEMO VL1	Range of transmission 0
Calculated			Printout limit (ratio)
Formula (Res. 1/Res. 2) x K			Minimum 0.10
Coefficient K 1.000			Maximum 5.00

Détermination chronométrique



I. RECONSTITUTION DU REACTIF, HEMOCLOT Factor V-L (Réf : ACK061L)
(Réf : ACK061K)

Nom	Reconstitution	Stabilité	Stabilisation en T°
R1	4ml d'eau distillée (*)	24H à 2° 8°C 8 H à T° ambiante 1 mois à -20°C	30 minutes avant toute utilisation (**)
R2A	1ml d'eau distillée (*)	24H à 2° 8°C 8 H à T° ambiante 1 mois à -20°C	30 minutes avant toute utilisation (**)
R2B	1ml d'eau distillée (*)	24H à 2° 8°C 8 H à T° ambiante 1 mois à -20°C	30 minutes avant toute utilisation (**)
R3	4ml d'eau distillée (*)	24H à 2° 8°C 8 H à T° ambiante 1 mois à -20°C	30 minutes avant toute utilisation (**)

Reconstitution

(*) Après reconstitution en eau distillée, respecter un temps de stabilisation de 30 minutes à température ambiante.

Stabilisation en température du réactif

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

Ne pas inter changer les flacons de réactifs provenant de lots différents

II. Reconstitution des contrôles

Nom	Reconstitution	Stabilité	Stabilisation en T°
CONTROLES <u>Biophen Normal Control Plasma</u> (réf A223201)	1 ml d'eau distillée (*)	24 heures à 2°-8°C 8 heures à T° ambiante Ne pas congeler	30 minutes à bord du STA avant toute utilisation (**)
<u>Biophen ACT PCr Control Plasma</u> (réf A223405)	0.5 ml d'eau distillée (*)	24 heures à 2° - 8°C 8 heures à T° ambiante Ne pas congeler	30 minutes à bord du STA avant toute utilisation (**)

Reconstitution

(*) Après reconstitution en eau distillée des plasmas de contrôles, respecter un temps de stabilisation de 30 minutes à température ambiante.

Conservation des réactifs

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

Ne pas congeler les plasmas de contrôles.

III. RESULTATS

- Les valeurs des patients et des contrôles sont directement rendus en temps, et les résultats sont exprimés en ratio VL2/VL1 ou T2/T1.
- Le calcul du rapport des temps de coagulation T1 et T2, réalisé sans ou avec de la Protéine C activée (PCA), permet de mesurer la sensibilité du Facteur V à l'action de la Protéine C Activée.
- Un plasma normal, contenant du Facteur V normal donne un rapport $T2/T1 \geq 2.00$
Un plasma normal peu sensible à l'action de la PCA (Facteur V-L) donne un rapport $T2/T1 \leq 1.80$
- La biologie moléculaire permet de confirmer le type hétérozygote ou homozygote.

NOTA : Pour un même lot de réactifs, et un même plasma, les temps T1 et T2 peuvent varier selon l'instrument utilisé, et selon la sensibilité du réglage de la détection de la formation du caillot. Cela peut induire des variations du rapport T2/T1, et des seuils utilisés de 1,80 et 2,00. Vérifier les valeurs seuils et la zone normale pour le lot de réactifs et l'instrument utilisé, et, le cas échéant, les ajuster en conséquence

IV. PROGRAMMATION DE L'ANALYSEUR

Programmer 2 configurations VL1 et VL2

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 :

CONFIGURATION – Page 1 / 3

Identification									
Abréviation		Nom			Méthode			Date	
VL2		HEMO VL 2			CHRONOMETRIE				
Echantillon				Diluant					
Volume	Incu	Dil.	Id.	Nom			Flac.	stab	Vol. min.
50µl	0 sec	1/10	11361	OWREN KOLLER			15 ml	72h	0.90ml
réactifs									
Id.	Nom	Incu sec	Vol. µl	Flac ml	Stab h	Vol min. ml	Lavage		
							Avant	Après	
Ra R1	R1 HEM VL	0	50	4	8	0.2	non	normal	
Rb R2B	R2B HEM VL	120	25	1	8	0.2	non	special	
Rc									
Rd R3	R3 HEM VL		50	4	8	0.2	non	intensif	
Analyse		Résultat				Acceptation (sec)			
Temps min	40	Unité principale		sec		préfixe Standard	min	max	
Temps max	250	Fact. correction		1.000			10	250	
Temps moy	70	détermination		simple					
Chauffage Rd	oui	Ecart/ moyenne max		5,0%					
Agitation	oui	Redil. Critères		sec					
caillot	normal	<							
		>							

Rentrer les données suivantes concernant les lavages.

LAVAGE				
	Ra	Rb	Rc	Rd
Avant	non	non		non
Après	normal	spécial		intensif
Nettoyant		12227		
Nom		DESORB U		
Flacon ml		15		
Stab. H		120		
Vol in. ml		0.90		

Afficher la seconde page et rentrer les données suivantes concernant les contrôles.

CONFIGURATION – Page 2 / 3

Calibration						
Mode Brut les résultats sont rendus en unités de mesure sec						
Contrôles						
	Id.	Clé	Nom	Flac. ml	Stab. H	Volume min. ml
Niveau 1						
Niveau 2						

Afficher la dernière page et rentrer les données suivantes concernant le contrôle qualité.

Le STA offre la possibilité de gérer 3 niveaux différents de contrôles de qualité. A titre d'exemple, la configuration suivante est possible. Il est recommandé de passer au minimum 1 contrôle qualité

CONFIGURATION – Page 3 / 3

Edition / Transmission							
		Facteur convers.	Edition	Rang en transmission	Valeurs Usuelles		sec
Unité Principale	sec		oui	0	STANDARD	Min.	Max.
Aux.1						10	250
Aux.2							
Aux.3							
Limites d'édition			min	10 sec			
			max	250 sec			
Contrôles							
	Id.	Clé	Nom	Période H	Flac. ml	Stab. H	Volume min. ml
Niveau 1	BNC		B N CONT	24	1	48	0.2
Niveau 2	VL AB		VL AB CONT	24	1	48	0.2
Niveau 3							

Identification									
Abréviation		Nom			Méthode			Date	
VL 1		HEMO VL 1			CHRONOMETRIE				
Echantillon				Diluant					
Volume	Incu	Dil.	Id.	Nom			Flac.	stab	Vol. min.
50µl	0 sec	1/10	11361	OWREN KOLLER			15 ml	72 h	0.90ml
Réactifs									
Id.	Nom	Incu sec	Vol. µl	Flac ml	Stab h	Vol min. ml	Lavage		
							Avant	Après	
Ra R1	R1 HEM VL	0	50	4	8	0.20	non	normal	
Rb R2A	R2A HEM VL	120	25	1	8	0.20	non	intensif	
Rc									
Rd R3	R3 HEM VL		50	4	8	0.20	non	intensif	
Analyse		Résultat				Acceptation sec			
Temps min	20	Unité principale		sec		préfixe Standard	min	max	
Temps max	90	Fact. correction		1.000			20	90	
Temps moy	40	détermination		simple					
Chauffage Rd	oui	Ecart/ moyenne max		5,0%					
Agitation	oui	Redil. Critères		sec					
caillot	normal	<							
		>							

Rentrer les données suivantes concernant les lavages.

LAVAGE				
	Ra	Rb	Rc	Rd
Avant	non	non		non
Après	normal	intensif		intensif
Nettoyant				
Nom				
Nom				
Flacon ml				
Stab. H				

Afficher la seconde page et rentrer les données suivantes concernant les contrôles.

CONFIGURATION – Page 2 / 3

Calibration						
Mode : Mode Brut les résultats sont rendus en unités de mesure sec						
Contrôles						
	Id.	Clé	Nom	Flac. ml	Stab. H	Volume min. ml
Niveau 1						
Niveau 2						

Afficher la dernière page et rentrer les données suivantes concernant le contrôle qualité.

Le STA offre la possibilité de gérer 3 niveaux différents de contrôles de qualité. A titre d'exemple, la configuration suivante est possible. Il est recommandé de passer au minimum un contrôle de qualité.

CONFIGURATION – Page 3 / 3

Edition / Transmission							
		Facteur convers.	Edition	Rang en transmission	Valeurs Usuelles		sec
Unité Principale	sec		oui	0	STANDARD	Min.	Max.
Aux.1				0		10	90
Aux.2							
Aux.3							
Limites d'édition			min	10 sec			
			max	90 sec			
Contrôles							
	Id.	Clé	Nom	Période H	Flac. ml	Stab. H	Volume min. ml
Niveau 1	BNC		B N CONT	24	1	48	0.2
Niveau 2	VL AB		VL AB CONT	24	1	48	0.2
Niveau 3							

Pour calculer le ratio, aller dans « **config** » et créer un test.
 Choisir dans la fenêtre l'option « **Résultats calculés** »

La fenêtre suivante apparaît, la remplir comme suit :

Identification					
Abréviations		Nom		Méthode	Date
VLRATIO		VLRATIO		Résultat calculé	
Test Primaire				Edition /Transmission	
	Abréviations	Nom		Unité	Ratio
				Edition	oui
1	VL2	HEMO VL2		Rang de transmission	0
2	VL1	HEMO VL1		Limite d'édition	(ratio)
				Minimum	0.10
				Maximum	5.00
Calcul					
Formule		(Rés. 1/Rés. 2) x K			
Coefficient K		1.000			