

BIOPHEN™ FVII

REF 221304

R1 R3 2 x 4 mL; R2 2 x 2 mL; R4 4 x 25 mL

Méthode chromogène pour la détermination quantitative du Facteur VII.
POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.
NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.

Français, dernière révision : 01-2021

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN™ FVII est une méthode chromogène proposée pour la détermination quantitative de l'activité du Facteur VII (FVII) en milieu purifié ou plasmas citratés, en utilisant une méthode chromogénique, manuelle ou automatisée.

Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

RESUME ET EXPLICATION :

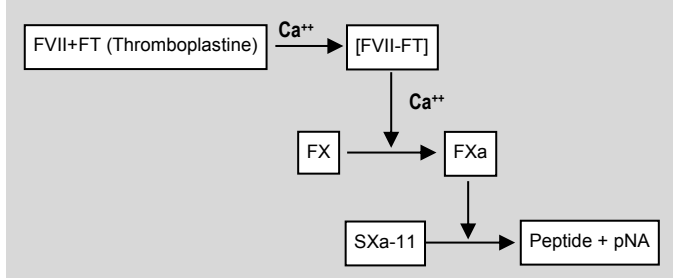
Le Facteur VII est la sérine estérase de la voie exogène de la coagulation. Complexée au Facteur tissulaire (FT), en présence de phospholipides et de calcium, il active le Facteur X (FX) en Facteur Xa (FXa).

Le coffret BIOPHEN™ FVII est un dosage chromogène du Facteur VII.

PRINCIPE :

En présence de facteur tissulaire (thromboplastine) et de calcium, le FVII forme un complexe enzymatique qui active le FX, présent en quantité constante et en excès, en FXa. La quantité de FXa formée est fonction du taux de FVII à doser. Ce FXa ainsi formé clive le substrat spécifique du FXa (Sxa-11) et libère le pNA. La quantité de pNA libéré est directement proportionnelle à l'activité du FXa.

Le taux de FVII présent dans l'échantillon à doser est donc directement proportionnel à l'activité du FXa formé, déterminée par la quantité de pNA libéré, et mesurée par la densité optique à 405nm.

**REACTIFS :**

R1 **Factor X (Human)**, lyophilisé. Contient du Facteur X à la concentration optimale pour le test et de la BSA.

2 flacons de 4 mL.

R2 **Thromboplastin calcium**, lyophilisé. Contient de la thromboplastine, du calcium et de la BSA.

2 flacons de 2 mL.

R3 **Sxa-11**, lyophilisé. Substrat chromogénique spécifique du Facteur Xa (Sxa-11). Contient 8 mg de Sxa-11.

2 flacons de 4 mL.

R4 **Tris-BSA buffer** à pH 7,40. Prêt à l'emploi. Contient de la BSA.

4 flacons de 25 mL.

Le réactif **R4** contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L), voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

• Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.

• L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.

• L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.

• Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.

- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

R2 H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

PREPARATION DES REACTIFS :

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

Reconstituer chaque flacon avec exactement :

R1 **R3** 4 mL d'eau distillée.

R2 2 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

R4 Réactif prêt à l'emploi, Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE :

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R1 **R2** La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- **48 heures** à 2-8°C.
- **8 heures** à température ambiante (18-25°C).
- **Ne pas congeler.**
- **Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

R3 La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- **3 mois** à 2-8°C.
- **7 jours** à température ambiante (18-25°C).
- **Ne pas congeler.**
- **Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

R4 Le réactif, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine à 2-8°C est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :**Réactifs :**

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou d'acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Reference
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101-RUO
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201-RUO
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301-RUO

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels :

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes en plastique ou microplaque.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁷ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références⁸.

PROCEDURE :

Le coffret BIOPHEN™ FVII peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405nm.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage :

1. La calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon de concentration (C) en FVII précisément définie ou d'un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes ou femmes de 18 à 55 ans, sans traitements ou pathologies connues) qui par définition titre 100% de FVII. Le dosage intègre une dilution standard du plasma au 1/1000. La dilution du plasma au 1/1000 représente par définition le taux 100% de l'activité du FVII. La gamme de calibration va de 0 à 200% de FVII. La dilution au 1/500 du pool de plasma ou de l'étalon représente 200% de l'activité du FVII. La dilution au 1/1000 correspond à la concentration (C) en FVII indiquée, et le 1/500 à deux fois cette concentration. Pour un étalon titrant C, le taux de 200% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : 500xC/100.

Afin d'obtenir une dilution précise, prédiluer le pool de plasma au 1/25 puis 1/20 en tampon Tris-BSA [R4], pour obtenir une dilution finale de 1/500 (soit 200% de FVII). A partir de cette solution, faire la gamme de calibration suivante :

FVII (%)	0	50	100	200
Plasma étalon dilué au 1/500 (µL)	0	125	250	500
[R4] Tampon Tris-BSA (µL)	500	375	250	0

2. Diluer les échantillons dans du tampon Tris-BSA [R4] comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution
Contrôles	223201-RUO 223301-RUO	1/1000
Echantillons	n.a	1/1000

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Pour les milieux purifiés avec une concentration en FVII différente des plasmas, diluer l'échantillon en [R4] afin d'obtenir une concentration finale en FVII dans l'échantillon testé comprise entre 0,1 et 1 ng/mL (soit 20 à 200% de FVII selon ce protocole).

4. Dans un tube plastique ou dans les puits d'une microplaque incubé à 37°C, introduire :

	Microplaque	Tube plastique
Etalon, Contrôles, ou échantillons dilués	30 µL	100 µL
[R2] Thromboplastin Calcium preincubée à 37°C	30 µL	100 µL
[R1] Factor X (human) preincubé à 37°C	60 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 7 minutes, puis introduire:		
[R3] Sxa-11 preincubé à 37°C	60 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant exactement 5 minutes:		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%)*	60 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

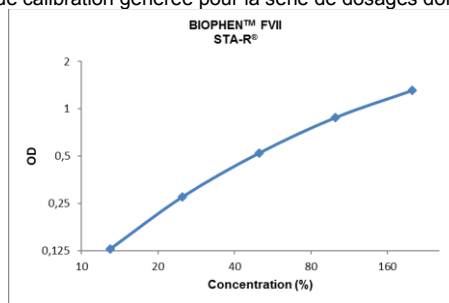
*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures. Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R3, R1, R2, échantillon dilué. Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION :

Le test BIOPHEN™ FVII peut être calibré pour le dosage du Facteur VII. L'étalon couvrant la zone de test dynamique est disponible chez HYPHEN

BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration. La courbe de calibration ci-dessous, obtenue avec l'étalon BIOPHEN™ Plasma Calibrator sur STA-R®, est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la courbe de calibration ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Des contrôles qualité doivent être inclus dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire afin de valider les résultats du test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactifs, ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir et vérifier ses propres valeurs cibles, les zones d'acceptation et les performances attendues, selon les instruments et les protocoles utilisés.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la courbe de calibration Log-Log, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de FVII en %. Le tracé doit correspondre à un polynôme de degré 2.
- La concentration de Facteur VII dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration.
- Les résultats sont exprimés en % de Facteur VII.
- Si la dilution utilisée est 1/1000, le taux de Facteur VII est obtenu directement sur la courbe. Si d'autres dilutions sont utilisées, le taux mesuré, doit être multiplié par le facteur de dilution « D » divisé par 1000, soit D/1000.

Les résultats doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.

PERFORMANCES :

- La limite basse de détection est ≤ 5%.
- Le domaine de mesure est compris entre 5 et 200%.

REFERENCES :

1. Seligsohn U, et al., Coupled amidolytic assay for factor VII: its use with a clotting assay to determine the activity state of factor VII. Blood. 1978.
2. Clarke BJ, et al., The first epidermal growth factor domain of human coagulation factor VII is essential for binding with tissue factor. FEBS. 1992.
3. Ledwozyw A, et al., The estimation of factor VII in livestock plasma of domestic animals by the use of tripeptide chromogenic substrate. Arch Vet Pol. 1993.
4. Chang YJ, et al., Engineered recombinant factor VII Q217 variants with altered inhibitor specificities. Biochemistry. 1999.
5. Natacha CJ, et al., Increased volume of distribution for recombinant activated factor VII and longer plasma-derived factor VII half-life may explain their long lasting prophylactic effect. Thrombosis Research. 2013.
6. Dorkin JR. Development and mechanistic analysis of in vivo liposomal nanoparticle delivery of siRNA and mRNA. B.A. Biological Chemistry Swarthmore College. 2006.
7. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
8. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.

SYMBLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version