

BIOPHEN™ Factor VIIa

REF 221312

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

Détermination quantitative de l'activité du Facteur VIIa, en milieu purifié, par méthode chromogène.

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.**NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE DIAGNOSTIC.**

Français, dernière révision : 08-2017

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN™ Factor VIIa est une méthode chromogène proposée pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur VII activé (FVIIa), en milieu purifié, en utilisant une méthode manuelle ou automatique.

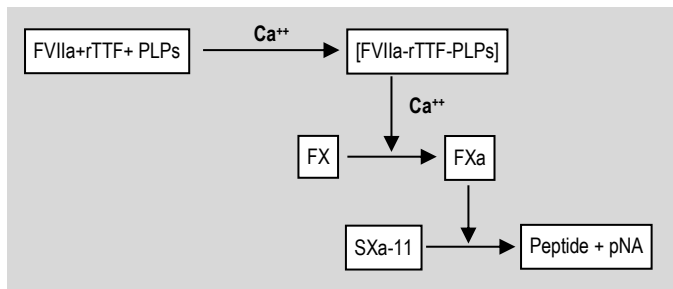
Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

PRINCIPE :

Le Facteur VII est une sérine estérase de la voie extrinsèque de coagulation. Lorsqu'il est complexé avec le Facteur Tissulaire (FT), en présence de phospholipides et de calcium, il active le Facteur X en Facteur Xa.

Le coffret BIOPHEN™ Factor VIIa n'est pas sensible au Facteur VII.

Le Facteur VIIa forme un complexe enzymatique avec le facteur tissulaire humain recombinant tronqué (rTTF) et les phospholipides synthétiques. Le complexe active ensuite le Facteur X présent dans le milieu à concentration constante et en excès, en Facteur Xa. L'activité du FXa est mesurée à l'aide d'un substrat chromogène spécifique (Sxa-11). Le Facteur Xa ainsi formé hydrolyse le substrat chromogène qui libère de la paranitroaniline (pNa). La quantité de pNa libérée est directement proportionnelle à l'activité du Facteur Xa. Finalement, il existe une relation directe entre la quantité de Facteur VIIa dans l'échantillon testé et l'activité du Facteur Xa généré, mesurée par la quantité de pNa libérée, déterminée par le développement de la couleur à 405 nm.

**REACTIFS :**

R1 FX humain, à une concentration optimale pour le dosage, lyophilisé en présence de stabilisants. Contient de la BSA.

2 flacons de 4 mL.

R2 Cofacteur (rTTF) et phospholipides synthétiques, à une concentration optimale pour le dosage, lyophilisés en présence de stabilisants. Contient de la BSA.

2 flacons de 2 mL.

R3 Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (Sxa-11), lyophilisé.

2 flacons de 4 mL.

R4 Tampon de dilution spécifique Tris-BSA, à pH 7,50. Prêt à l'emploi. Contient de la BSA.

2 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 :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Eviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.

- Le plasma humain utilisé pour la préparation du Facteur X a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VHC. Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- Pour usage *in vitro*.

R1 R2 H315 : Provoque une irritation cutanée.
H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.
H335 : Peut irriter les voies respiratoires.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS:

Les flacons sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R1 Réactif 1 : Facteur X humain

Reconstituer chaque flacon avec exactement **4 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **72 heures** à 2-8°C.
- **24 heures** à température ambiante (18-25°C).

R2 Réactif 2 : Cofacteur (rTTF) et phospholipides synthétiques

Reconstituer chaque flacon avec exactement **2 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **72 heures** à 2-8°C.
- **24 heures** à température ambiante (18-25°C).

R3 Réactif 3 : Substrat chromogène

Reconstituer chaque flacon avec exactement **4 mL d'eau distillée**, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **1 mois** à 2-8°C.
- **7 jours** à température ambiante (18-25°C).

R4 Réactif 4 : Tampon de dilution spécifique Tris-BSA

Prêt à l'emploi. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), avant utilisation.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- **7 jours** à 2-8°C.
- **7 jours** à température ambiante (18-25°C).

CONDITIONS DE STOCKAGE :

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.

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

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Etalons et contrôles spécifiques avec titration connue tels que Standard International pour FVIIa NIBSC¹ ou préparations de référence et contrôles internes pour FVIIa.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène.
- Chronomètre, Pipettes calibrées.

PROCEDURE :

Le coffret 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 mesurée à 405nm.

Méthode automatisée :

Les applications sur différents automates sont disponibles sur demande. **Se reporter à l'application spécifique et aux précautions spécifiques de chaque automate.**

Méthode de dosage (manuelle) :

1. Reconstituer la préparation de référence ou l'étalon et les contrôles (deux niveaux recommandés à environ 75 et 250 mUI/mL) en utilisant les notices spécifiques ou selon la procédure interne.

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en Facteur VIIa (standard international ou standard interne).

Pré-diluer ce matériel en tampon R4 (au moins 1/2 ou plus) pour obtenir une solution à environ 400 mUI/mL (notée C) puis effectuer à partir de cette solution une gamme d'étalonnage en tampon R4.

Préparer les points de calibration dans l'intervalle d'environ 0-400 mUI/mL (voir l'exemple du tableau ci-dessous).

Etalon	C	C/2	C/4	C/8	C/12	0
FVIIa (mUI/mL)	~400	~200	~100	~50	~33,3	0
Volume étalon	1 mL	0,5 mL	0,25 mL	0,125 mL	0,0833 mL	0 mL
Volume tampon R4	0 mL	0,5 mL	0,75 mL	0,875 mL	0,9167 mL	1 mL

D'autres points de calibration peuvent être ajoutés si nécessaire. Afin d'obtenir les performances optimales, la courbe de calibration doit être préparée juste avant l'exécution du dosage.

Pour information, correspondance entre ng/mL et UI/mL :

Concentration en ng/mL	Concentration en UI/mL
20 ng/mL	1 UI/mL
1 ng/mL	50 mUI/mL

2. Diluer les échantillons et les contrôles dans du tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Prédilution
Echantillon (FVIIa en milieu purifié)	Ajusté à 50-350 mUI/mL la zone optimale en tampon R4 (1/2 ou plus)
Contrôles	1/2 ou plus

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité.

Pour le FVIIa en milieu purifié, les échantillons testés peuvent être prédilués dans le tampon R4 (au moins 1/2 ou plus), pour obtenir une concentration en FVIIa attendue dans l'intervalle 0 à C mUI/mL (la concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution »).

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C :

Réactifs	Microplaque	Volume
Etalons, contrôles ou échantillon à tester (prédilués en R4)	30 µL	100 µL
R2 : Cofacteurs -PLPs préincubé à 37°C	30 µL	100 µL
R1 : Factor X préincubé à 37°C	60 µL	200 µL
Mélanger et incubé pendant exactement 4 min à 37°C, puis introduire :		
R3: Substrat Sxa-11 préincubé à 37°C	60 µL	200 µL
Mélanger et incubé pendant exactement 4 min à 37°C :		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide Citrique (2%) [*]	60 µL	200 µL
Mélanger et mesurer l'absorbance 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, échantillons dilués.

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Méthode de dosage (cinétique)

Le dosage peut être lu en utilisant un mode cinétique. Dans ce cas, la variation de l'absorbance est enregistrée entre deux points suite à l'addition du substrat. Il est alors inutile de soustraire le blanc échantillon, ou d'arrêter la réaction. Les résultats sont obtenus en utilisant le changement d'absorbance (ΔDO_{405}) pour les étalons, contrôles, et les échantillons testés.

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.

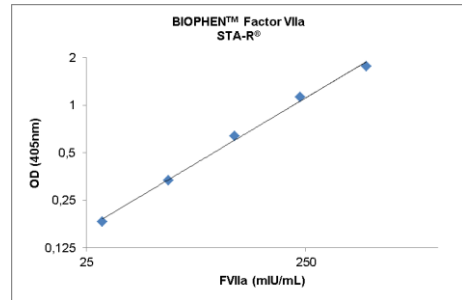
CALIBRATION :

Le test BIOPHEN™ Factor VIIa peut être calibré pour le dosage de l'activité du Facteur VIIa en milieu purifié.

En utilisant une échelle logarithmique :

- La calibration est linéaire d'environ 0 à 400 mUI/mL.

La courbe de calibration ci-dessous, obtenue avec du FVIIa recombinant purifié, 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 conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif 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 les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS :

Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration (Log-Log), en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de FVIIa en mUI/mL.

La concentration de FVIIa dans l'échantillon dilué dosé est déduite de la courbe de calibration. Lorsque des prédilutions sont utilisées, multiplier les concentrations de FVIIa mesurée par le facteur de prédilution afin d'obtenir la concentration dans l'échantillon testé (ex : multiplier par 2 pour une dilution au 1/2)

Les résultats sont exprimés en mUI/mL.

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. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.

Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.

Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.

Pour les échantillons > 400 mUI/mL, une dilution supplémentaire par deux (ou plus) peut être utilisée et les résultats obtenus multipliés par le facteur de dilution additionnel.

PERFORMANCES :

La limite de détection pour le dosage est évaluée sur la courbe de calibration en mesurant la concentration « apparente » qui correspond à la moyenne DO à 405 nm obtenue pour un échantillon sans FVIIa + 3 écart-types (ET). Cette limite de détection est inférieure à 25 mUI/mL de FVIIa.

Le domaine de mesure est compris entre environ 25 et 400 mUI/mL.

Spécificité : le dosage est spécifique du FVIIa. Le FVII n'est pas mesuré (pour information, la réactivité du FVII est attendue à <1% de celle obtenue pour le FVIIa).

Le CV inter-essais est attendu <10%.

REFERENCES :

1. WHO International Standard, Blood Coagulation Factor VIIa, concentrate, Human, 2nd International Standard, NIBSC, 07/228.

SYMBOLS :

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.