



HEMOCLLOT™ Factor VIIa

Ref CK092K

R1, R2: 3 x 2 mL ; R3: 3 x 20 mL

Méthode coagulante pour le dosage quantitatif de l'activité du FVIIa, en milieu purifié ou plasmatique.

UTILISATION :

Le coffret HEMOCLLOT™ Factor VIIa est une méthode coagulante proposée pour la détermination quantitative de l'activité du Facteur VII activé (FVIIa) en milieu purifié ou plasma citraté, en utilisant une méthode manuelle ou automatisée.

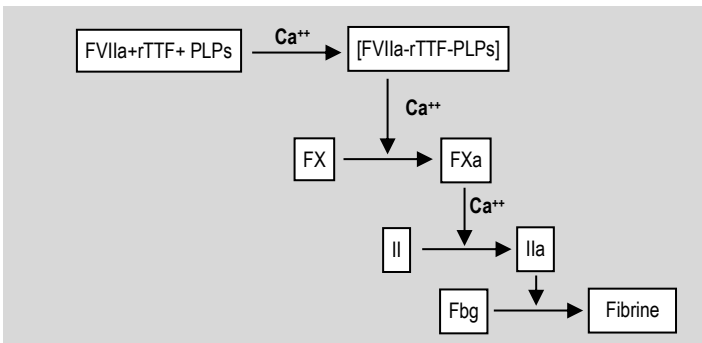
RESUME ET EXPLICATION :

Le FVIIa est une sérine estérase de la voie de coagulation extrinsèque¹. Complexé au Facteur Tissulaire (FT), en présence de phospholipides et de calcium, il active le Facteur X en Facteur Xa.

L'HEMOCLLOT™ Factor VIIa est un test de coagulation permettant de mesurer l'activité du FVIIa. Il est insensible au Facteur VII.

PRINCIPE :

Le FVIIa forme un complexe enzymatique avec le facteur tissulaire recombinant humain tronqué (rTTF) ; ce facteur tissulaire recombinant ne permet pas l'activation du facteur VII². La coagulation est initiée par l'addition de calcium (Ca²⁺). Le temps de coagulation est alors enregistré. Le FVIIa étant le facteur limitant, il existe une relation linéaire directe entre la concentration du FVIIa et le temps de coagulation correspondant.



REACTIFS :

R1 : Facteur VII déficient plasma, plasma humain citraté, rendu déficient en Facteur VII par immuno-déplétion, lyophilisé en présence de glycine et de stabilisateurs.
3 flacons de 2 mL.

R2 : Facteur VIIa Cof-PLPs : FT recombinant humain tronqué (rTTF) et phospholipides synthétiques, à la concentration optimale pour l'essai, lyophilisés en présence de stabilisateurs. Contient de la BSA.
3 flacons de 2 mL.

R3 : Tampon Hepes BSA : tampon de dilution spécifique Hepes-BSA, à pH 7,40. Prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
3 flacons de 20 mL.

Le réactif R3 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.
- 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 plasma déficient 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.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

Français, dernière révision : 01-2021

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 du produit à l'ouverture du flacon.

R1: Réactif 1 : Facteur VII déficient plasma

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 :

- **3 jours** à 2-8°C.
- **48 heures** à température ambiante (18-25°C).
- **2 mois** congelé à -20°C ou moins*

R2: Réactif 2 : Facteur VIIa Cof-PLPs

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 :

- **3 jours** à 2-8°C.
- **48 heures** à température ambiante (18-25°C).
- **2 mois** congelé à -20°C ou moins*

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C en adaptant la durée d'incubation au volume de réactif. La stabilité du réactif décongelé doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire.

R3: Réactif 3 : Tampon Hepes BSA

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

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

Dans son emballage d'origine, et conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation.

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.
- CaCl₂ à 0,025M (AR001B/AR001K/AR001L).
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que Standard International pour FVIIa (NIBSC)³, ou préparation et contrôles de référence internes pour FVIIa.
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Reference
BIOPHEN™ Calibrator Factor VIIa	226301
BIOPHEN™ FVIIa Control Set	224901

Matériels:

- Bain-Marie, automate de coagulation semi-automatique ou automatique.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes en plastique ou microplaque.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :

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-A5⁴ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Echantillons :

Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique).

Prélèvement :

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

Centrifugation :

Dans les 2 heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

Conservation du plasma :

- 4 heures à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois à -20°C.
- 18 mois à -70°C⁵.

Les échantillons de plasma congelés doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

PROCEDURE :

Le coffret est une méthode coagulante manuelle ou automatisée. Le test est réalisé à 37°C, et le temps de coagulation, déclenché par l'ajout de calcium, est mesuré.

Méthode automatisée :

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

Méthode de dosage :

1. Reconstituer les étalons et les contrôles (2 niveaux recommandés à environ 75 et 250 mUI/mL) comme indiqué dans les notices spécifiques ou selon la pratique interne. Préparer des points de calibration sur la zone 12,5-500 mUI/mL. Les diluer **1/10** en tampon **R3** pour le test.

2. Diluer les échantillons et contrôles dans du tampon R3 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Predilution	Dilution
Contrôles	Non	1/10
Echantillons à tester (plasma)	Non	1/10
Echantillons à tester (FVIIa en milieu purifié)	Ajustée sur zone optimale 25-400 mUI/mL, dans le tampon R3	1/10

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés dans l'heure, s'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 kit.

Pour information, les correspondances 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

3.

Réactifs	Volume
Etalons, Contrôles ou échantillons à tester (dilués au 1:10 en R3)	50 µL
R1 : FVII Déficient Plasma. Préincubé à 37°C	50 µL
Mélanger et incuber à 37°C pendant 1 minute , puis introduire :	
R2 : rTTF + Phospholipides. Préincubé à 37°C	50 µL
Mélanger et incuber à 37°C pendant 2 minutes , puis introduire :	
CaCl ₂ 0.025M (Préincuber à 37°C, sous agitation)	50 µL
Mesurer le temps de coagulation	TC (sec)

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 :

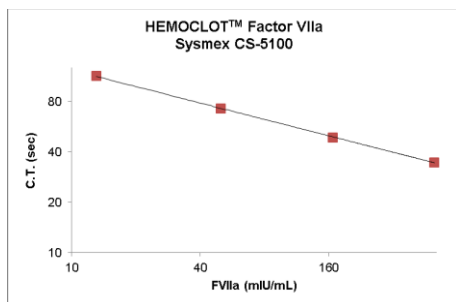
Le test HEMOCLOT™ Factor VIIa peut être calibré pour le dosage de l'activité FVIIa en milieu plasmatique ou purifié.

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.

En utilisant une échelle bi-logarithmique :

- Le test est linéaire au moins jusqu'à 500 mUI/mL (jusqu'à 1000 mUI/mL sur instruments Sysmex® CS et STA-R®).

La courbe de calibration ci-dessous, obtenue avec le Standard International NIBSC pour FVIIa, sur Sysmex® CS-5100, 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, tracer la droite de calibration (Log-Log), en portant en ordonnées le temps de coagulation (TC, sec) et en abscisses la concentration de FVIIa en mUI/mL.
- La concentration de FVIIa dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration lorsque la dilution standard est utilisée. Lorsque des prédilutions complémentaires sont utilisées, multiplier la concentration de FVIIa mesurée par le facteur de prédilution complémentaire afin d'obtenir la concentration dans l'échantillon testé.
- Les résultats sont exprimés en mUI/mL de FVIIa.
- Sur plasma, les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique 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 prélèvement suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Pour les échantillons mesurés > 500 mUI/mL, une dilution supplémentaire par deux (ou plus) peut être utilisée, et les résultats obtenus multipliés par le facteur de dilution additionnel.
- Pour l'influence possible d'interférences, se reporter à l'application spécifique pour l'instrument utilisé (aucun effet significatif n'est observé sur Sysmex® CS-5100 pour des taux d'héparines (HBPM ou HNF) jusqu'à 0,5 UI/mL, de bilirubine jusqu'à 30 mg/dL, d'hémoglobine ou d'intralipides jusqu'à 1000 mg/dL et jusqu'à 50ng/mL d'Apixaban, Rivaroxaban ou Dabigatran, par tests de surcharge en plasma).

VALEURS ATTENDUES :

La zone thérapeutique⁶ pour le FVIIa doit être définie selon les recommandations locales en vigueur. Les valeurs obtenues sur des sujets sains varient d'un laboratoire à l'autre, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

Une étude portant sur des sujets apparemment sains (n = 120) sur Sysmex® CS-5100 a déterminé le domaine de référence suivant (Central 90%, 95^e percentile) : 20 - 114 mUI/mL.

PERFORMANCES :

- La limite basse de détection sur Sysmex® CS-5100 est <1 mUI/mL.
- Le domaine de mesure est compris entre 5 et 500 mUI/mL.
- Le test HEMOCLOT™ Factor VIIa est insensible au FVII à concentration normale.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur 3 lots de réactif sur Sysmex® CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire, sur 40 valeurs (intra-essai), ou pour l'inter-essais sur 20 jours, 2 séries par jour et 3 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	n	Moy. (mUI/mL)	CV%	SD	n	Moy. (mUI/mL)	CV%	SD
CQ1	40	82,7	1,9	1,6	120	83,7	4,3	3,6
CQ2	40	261,5	2,2	3,6	120	262,9	2,7	7,2

REFERENCES :

- Giansily-Blaizot M, *et al.*, Study group of FVII deficiency. Analysis of biological phenotypes from 42 patients with inherited factor VII deficiency: can biological tests predict the bleeding risk? *Haematologica*. 2004
- Neuenschwander PF, *et al.*, Deletion of the membrane anchoring region of tissue factor abolishes autoactivation of factor VII but not cofactor function. Analysis of a mutant with a selective deficiency in activity. *J Biol Chem*. 1992
- WHO International Standard, Blood Coagulation Factor VIIa, Concentrate, Human, 2nd International Standard, NIBSC 07/228.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
- Woodhams B, *et al.*, Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood coagulation and Fibrinolysis*. 2001.
- Logan AC and Goodnough LT. Recombinant factor VIIa: an assessment of evidence regarding its efficacy and safety in the off-label setting. *Hematology*. 2010.

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.