

BIOPHEN FVII

Ref A221304

Assay for measuring Factor VII in plasma with a chromogenic method

In vitro research use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 21/09/2009

INTENDED USE:

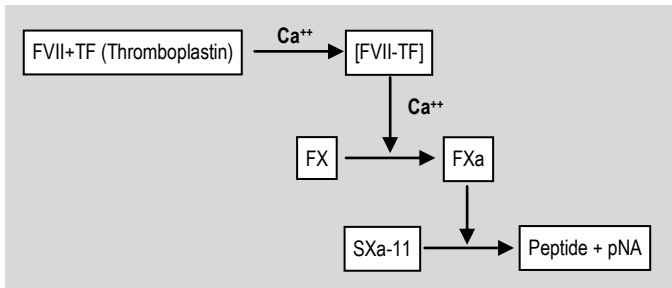
BIOPHEN FVII kit is a chromogenic assay proposed for measuring the Factor VII activity in human plasma or in biological fluids, using a chromogenic method, manual or automated.

CLINICAL APPLICATIONS:

Diagnosis of congenital or acquired Factor VII deficiencies.
Assay of Factor VII activity, in citrated human plasma or in any biological fluid where Factor VII activity must be measured.

ASSAY PRINCIPLE:

Factor VII is the serine esterase of the extrinsic coagulation pathway. When complexed to Tissue Factor (TF), in presence of phospholipids and Calcium, it activates Factor X to Factor Xa. Biophen Factor VII is a chromogenic assay for testing Factor VII activity. Factor VII forms an enzymatic complex with Tissue Factor, provided by rabbit Thromboplastin. It then activates Factor X, present in the assay at a constant concentration and in excess, to Factor Xa, which concentration is exactly measured by its activity on a specific Factor Xa chromogenic substrate (SXa-11). Factor Xa cleaves the substrate and generates pNA. The amount of pNA generated is directly proportional to the Factor Xa activity. Finally, there is a direct relationship between the amount of Factor VII in the assayed sample and the Factor Xa activity generated, measured by the amount of pNA released, determined by colour development at 405 nm.



REAGENTS:

R1: Reagent 1: Human Factor X

Human Factor X, lyophilised:
2 vials containing Factor X, at the optimized concentration for the assay (to be reconstituted with 4 mL of distilled water).

R2: Reagent 2: Calcium-Thromboplastin

Rabbit brain thromboplastin, containing calcium, lyophilised:
2 vials of rabbit brain thromboplastin, containing calcium (to be reconstituted with 2 mL of distilled water).

R3: Reagent 3: SXa-11

Chromogenic substrate, specific for Factor Xa (SXa-11), lyophilised:
2 vials containing 8 mg of SXa-11 (to be reconstituted with 4 mL of distilled water).

R4: Reagent 4: Tris-BSA Buffer

Ready to use, Tris-BSA Buffer, at pH 7.40, contains sodium azide (NaN₃).
4 vials of 25 mL.

Warning:

- Human Factor X was prepared from human plasma, which was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.
- Tris-BSA Buffer (R4) contains sodium azide, which may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Flush with large volumes of water when discarding into a sink.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

Reagents:

- Distilled water, preferentially sterile.
- Acetic Acid (20%) or Citric Acid (2%) (End point method).
- Plasma Calibrator (ex: BIOPHEN Plasma Calibrator Ref A222101).
- Normal or Abnormal Quality Control Plasmas (ex: BIOPHEN Normal Control Plasma Ref A223201, and BIOPHEN Abnormal Control Plasma Ref A223301).

Material:

- Spectrophotometer, photometer or automates for chromogenic assays, with a wave-length set up at 405 nm.
- Stop watch.
- Calibrated pipettes.

CONSERVATION:

BIOPHEN FVII reagents must be stored at 2-8°C, in their original packaging box. They are then stable until the expiration date printed on the box.

PREPARATION AND STABILITY OF REAGENTS:

R1: Reagent 1: Human Factor X

- Reconstitute each vial with exactly 4 mL of distilled water.
- Leave to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C).
- Shake gently before use.

Stability of reconstituted human Factor X, kept in its original vial:

- 48 hours at 2-8°C.
- 8 hours at Room Temperature (18-25 °C).
- Do not freeze.

R2: Reagent 2: Calcium-Thromboplastin

- Reconstitute each vial with 2 mL of distilled water.
- Leave to homogenize for 30 minutes at room temperature (18-25 °C).
- Shake gently before use.

Stability of restored reagent, kept in its original vial:

- 48 hours at 2-8°C.
- 8 hours at Room Temperature (18-25 °C).
- Do not freeze.

R3: Reagent 3: Factor Xa specific Chromogenic substrate (SXa-11)

- Reconstitute each vial with 4 mL of distilled water.
- Incubate at Room Temperature (18-25°C) for 30 minutes.
- Shake gently before use.

Stability of restored substrate, kept in its original vial:

- 3 months at 2-8°C.
- 7 days at Room Temperature (18-25 °C).
- Do not freeze.

R4: Reagent 4: Tris-BSA Buffer

Ready to use buffer; vial of 25 mL. Shake before use. It contains Sodium Azide (0.9 g/L). This reagent is stable until the expiration date printed on the label, when stored at 2-8°C, protected from any contamination.

Cautions:

- In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use (white caps for factor X (R1), Calcium-Thromboplastin (R2) and buffer (R4), yellow caps for SXa-11 (R3)).
- Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination during use.
- If the substrate becomes yellow, this indicates the presence of a contaminant. It must be rejected, and a new vial must be used.

Nota:

- R1, R2 and R3 vials are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any loss of powder when opening the vials.
- According to the automated method used, the reagents can be reconstituted with volumes different from those recommended. In any case, the established reactive ratios (respective reagent concentrations in the reactive milieu) between Factor X, Calcium-Thromboplastin and the Factor Xa substrate must be adhered to.
- Use only reagents from kits with the same lot number. Do not mix reagents from kits with different lots when running the assay. Reagents R1, R2 and R3 are optimized for each lot of kits.
- The stability studies at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature without damage.

PREPARATION OF PLASMA:

Blood (9 volumes) must be collected on 0.109 M citrate anticoagulant (1 volume), with great care, in a silicon glass or a plastic tube. Sampling must be performed through a net venipuncture, avoiding any blood activation.

- Within 4 hours, blood must be centrifuged at 3,000 g for 20 min at 18°C or below, and plasma decanted into a plastic tube, using a plastic pipette.
- Conservation of plasma:
 - Up to 8 hours at Room Temperature (18-25°C).
 - Up to 24 hours at 2-8°C.
 - Up to 1 month frozen at -20°C or below (before use, thaw for 15 min. in a water bath at 37°C).

TEST PROCEDURE:

BIOPHEN FVII kit is designed for use with automated kinetic methods but it can also be used for end point manual methods. Adaptations for the various automates are available upon request. The assay is performed at the controlled temperature of 37°C and the colour development is measured at 405 nm.

D.750.02/BI/1304



6560 Gove Court - Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@anlara.com

www.anlara.com

CALIBRATION:

Calibration is performed with a normal pooled citrated plasma (at least 30 normal individuals, males or females, aged between 18 and 55 years, and free of any medication or disease), with the assigned value of 100 % Factor VII. The assay includes a standard plasma dilution of 1:1,000. By definition, this latter dilution of the pool represents the 100 % Factor VII activity. The dynamic range is from 0 to 200 % Factor VII. The 200 % Factor VII activity is the 1:500 dilution of the plasma pool.

Note:

Alternatively, if calibration is performed with a commercially available plasma calibrator, with a known Factor VII concentration (C). The 1:1000 dilution corresponds to the indicated Factor VII concentration, and the 1:500 to twice this concentration. Using a plasma calibrator with a Factor VII concentration of C, the 200% FVII concentration is obtained (in the assay conditions) by using the following dilution factor: $500 \times C : 100$

In order to have an accurate dilution, predilute the pool plasma at 1:25, then 1:20 (i.e. 1:500 final dilution) with Tris-BSA buffer (R4). Using this dilution, prepare the calibration range as indicated here below:

% FVII	Plasma Calibrator (µL) Diluted 1/500	Tris-BSA Buffer (R4) (µL)
0	0	500
50	125	375
100	250	250
200	500	0

ASSAY PROTOCOL:

Manual Method:

Tested plasmas and controls are assayed at the 1:1,000 dilution in Tris-BSA buffer (R4).

For therapeutic concentrates or for biological fluids with Factor VII concentrations different from that of plasma, dilute the sample in order to get a final Factor VII concentration in the tested dilution in the range 0.1 to 1 ng/mL (i.e. 20 to 200 % Factor VII, using this protocol).

In a microplate well, or in a plastic tube preincubated at 37°C, introduce:

Reagents	Microplate	Test Tube
Calibrators, Controls, or tested plasmas diluted 1:1,000	30 µL	100 µL
R2 : Thromboplastin-Ca ⁺ preincubated at 37°C	30 µL	100 µL
R1 : Factor X preincubated at 37°C	60 µL	200 µL
Mix and Incubate for 7 min at 37°C, then introduce:		
R3: Sxa-11 Substrate preincubated at 37°C	60 µL	200 µL
Mix and Incubate for 5 min at 37°C, exactly		
Stop the reaction by introducing:		
Citric Acid (20g/L), or 20 % Acetic Acid	60 µL	200 µL
Mix and measure the Absorbance at 405nm against the sample blank.		

The yellow colour obtained is stable for 2 hours.

The sample blank is obtained by mixing the reagents in the opposite order from that of the test i.e.: Citric Acid (20 g/L), Sxa-11 substrate, diluted plasma, Factor X, Thromboplastin-Ca⁺.

Measure the Absorbance at 405 nm (A405). Subtract the sample blank from the A405 obtained for the assay.

Automated methods:

Adaptations for the various analysers are available upon request. The assay is then performed kinetically. The reaction does not require to be stopped and sample blanks are automatically subtracted.

NB:

- If higher or lower reactive volumes than those indicated here above are required for the method used, the same respective proportions between reagent concentrations and volumes used, must be adhered to, in order to maintain the assay performance.
- Run a sample blank in presence of highly lipemic, icteric or haemolysed plasmas, or if the plasmas has a "colour" different from the usual one.

RESULTS:

For the end-point method, using a bilogarithmic scale, plot on abscissa the Factor VII concentration (%) and on ordinates the corresponding absorbance (A405).

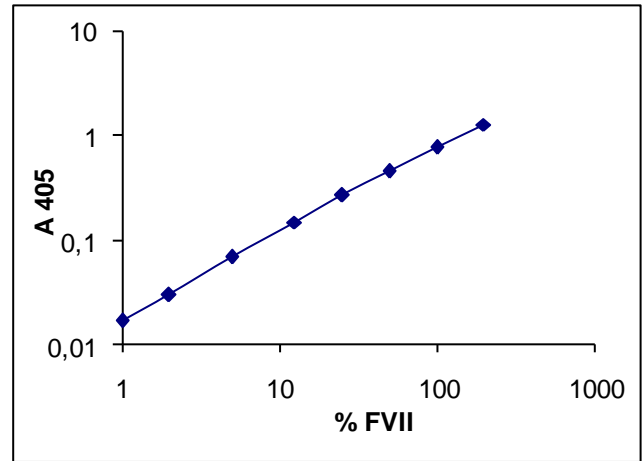
The factor VII concentration in the tested sample is directly obtained on the calibration curve. Results are expressed as % of a normal plasma pool.

- Using automated methods, the Factor VII concentrations are directly calculated by the analyser, respectively to the calibration curve, and the sample dilution used.
- The dynamic range is from 5 to 200 %.

When the assay dilution is 1:1,000, the Factor VII concentration is directly read on the calibration curve. When different dilutions are used, the results must be multiplied by the dilution factor "D", divided by 1,000, i.e. D/1,000.

EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curve below is an example only. Only the calibration curve generated for the series of assays performed must be used for calculating the Factor VII concentrations.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

The detection threshold for the assay is evaluated on the calibration curve by measuring the "apparent" Factor VII concentration, which corresponds to the mean A405 value obtained for a sample free of Factor VII plus 3 Standard Deviations (SD). This detection threshold is of 5 % for the Biophen Factor VII kit.

REFERENCES:

- Seligsohn U, Osterud B, Rapaport SI. Coupled amidolytic assay for factor VII : its use with a clotting assay to determine the activity stae of factor VII Blood 52(5) : 978-88 ; 1978.
- Avvisati G, ten Cate JW, van Wijk EM, Dahle LH, Mariani G. Evaluation of a new chromogenic assay for factor VII and its application in patients on oral anticoagulant treatment. Br J Haematol 45(2): 343-52; 1980.
- Poller L, Thomson HM, Bodzenta A, Easton AC, Latalo ZS, Chmielewska J. An assessment of an amidolytic assay for factor VII in the laboratory control of oral anticoagulants. Br J Haematol 49(1): 69-75; 1981.
- van Dieijen-Visser MR, van Wersch J, Brombacher PJ, Rosing J, Hemker HC, van Dieijen G. Use of chromogenic peptide substrates in the determination of clotting factors II, VII, IX and X in normal plasma and in plasma of patients treated with oral anticoagulant. Haemostasis 12(3): 241-55; 1982.
- Clarke BJ, Ofusu FA, Sridhara S, Bona RD, Rickles FR, Blajchman J. The firs epidermal growth factor domain of human coagulation factor VII is essential for binding with tissue factor. FEBS Lett 298(2-3): 206-10; 1992.
- Ledwozyw A, Jablonka S, Tusinska E, Herbut M. The estimation of factor VII in livestock plasma of domestic animals by the use of tripeptide chromogenic substrate. Arch Vet Pol 33(1-2): 123-7; 1993.
- van Wersch JW. A chromogenic assay for coagulation factor VII: analytical performance characteristics and application in several diseases. Int J Clin Lab Res 23(4): 221-4; 1993.
- Devies IE, Ubachs HM, van Wersch JW. The behaviour of amidolytic factor VII in smoking and non-smoking pregnant women in relation of their gestational age. Acta Obstet Gynecol Scand 76(5): 405-8; 1997.
- Topper MJ, Prasse KW. Chromogenic assays for equine coagulation factors VII, VIII, IX and X, and C1-esterase inhibitor. Am J Vet Res 59(5): 538-41; 1998.
- Chang YJ, Hamaguchi N, Chang SC, Ruf W, Shen MC, Lin SW. Engineered recombinant factor VII Q217 variants with altered inhibitor specificities. Biochemistry 28(34): 10940-8; 1999.

BIOPHEN FVII

Ref A221304

Dosage Fonctionnel du Facteur VII plasmatique, par méthode colorimétrique.

Pour recherche in vitro exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 21/09/2009

UTILISATION :

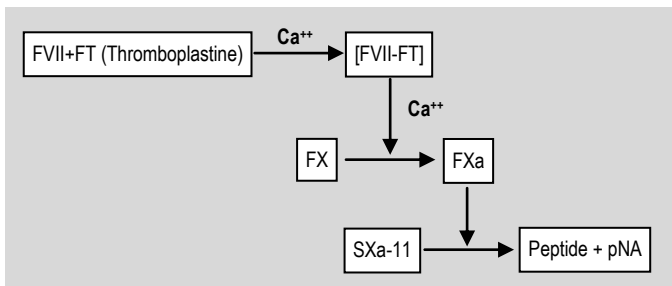
Le coffret BIOPHEN FVII est une technique chromogénique proposée pour la détermination in vitro de l'activité du facteur VII dans le plasma humain citraté, en utilisant une méthode amidolytique, manuelle ou automatisée.

APPLICATIONS :

Dosage du Facteur VII sur plasma citraté ou sur concentré thérapeutique de facteur VII.
Dosage du Facteur VII dans tout milieu biologique où ce facteur est recherché.

PRINCIPE :

Le facteur VII est la sérine estérase de la voie exogène de la coagulation qui, complexée au facteur tissulaire (FT), en présence de phospholipides et de calcium, active le facteur X en facteur Xa. La méthode BIOPHEN FVII est un dosage chromogénique du facteur VII. En présence de facteur tissulaire (thromboplastine de lapin) et de calcium, le facteur VII forme un complexe enzymatique qui active le facteur X, présent en quantité constante et en excès, en facteur Xa. La quantité de facteur Xa formée est fonction du taux de Facteur VII à doser. Ce facteur Xa ainsi formé clive le substrat spécifique du Xa (Sxa-11) et libère le pNA. La quantité de pNA libéré est proportionnelle au taux de facteur Xa formé et donc à la concentration de facteur VII à doser. Le taux de Facteur VII présent dans l'échantillon à doser est donc directement proportionnel à la quantité de Xa formé, déterminé par la quantité de pNA libéré, et mesurée par la densité optique à 405nm.



REACTIFS :

R1 : Réactif 1 : Facteur X humain

Facteur X humain, lyophilisé : 2 flacons de Facteur X humain, à la concentration optimale pour le test (à reconstituer par 4 ml d'eau distillée).

R2 : Réactif 2 : Thromboplastine calcique

Thromboplastine de lapin contenant du calcium, lyophilisée :
2 flacons contenant de la thromboplastine et du Calcium (à reconstituer par 2 ml d'eau distillée).

R3 : Réactif 3 : Sxa-11

Substrat chromogène spécifique du facteur Xa (Sxa-11), lyophilisé.
2 flacons de 8 mg (à reconstituer par 4 ml d'eau distillée).

R4 : Réactif 4 : Tampon Tris-BSA

Tampon Tris-BSA, 4 flacons de 25 ml, prêt à l'emploi, à pH 7,40, contenant de l'azide de sodium (la solution tampon est présentée dans un coffret séparé).

Précautions :

- Le plasma humain utilisé pour la préparation du Facteur X (R1) a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.
- Le réactif 4 (R4) contient 0,9 g/l d'azide de sodium. L'azide de sodium (NaN₃) peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.

REACTIFS ET MATERIELS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

Réactifs :

- Eau distillée, stérile de préférence.
- Acide acétique (20%) ou acide citrique 2% (méthode en point final).
- Plasmas de calibration (ex : BIOPHEN Plasma Calibrator (réf A222101)).
- Plasmas contrôles normaux ou anormaux (ex : BIOPHEN Normal Control Plasmaréf A223201 et BIOPHEN Abnormal Control Plasma réf A223301).

Matériels :

- Spectrophotomètre ou automates pour dosages chromogéniques, à 405 nm.
- Chronomètre.
- Pipettes calibrées.

CONSERVATION :

Les réactifs non encore utilisés doivent être conservés à 2-8 °C, dans leur coffret d'origine. Ils sont alors stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

R1 : Réactif 1 : Facteur X humain

- Reconstituer chaque flacon par exactement 4 ml d'eau distillée.
- Laisser stabiliser 30 minutes à température ambiante (18-25°C).
- Agiter délicatement avant utilisation.

Stabilité du Facteur X reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 48 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.

R2 : Réactif 2 : Thromboplastine calcique

- Reconstituer chaque flacon par exactement 2 ml d'eau distillée.
- Laisser stabiliser 30 minutes à température ambiante (18-25°C).
- Agiter délicatement avant utilisation.

Stabilité du flacon reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 48 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.

R3 : Réactif 3 : Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (Sxa-11)

- Reconstituer chaque flacon par exactement 4 ml d'eau distillée.
- Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes.
- Agiter délicatement avant utilisation.

Stabilité du substrat reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 3 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.

R4 : Réactif 4 : Tampon Tris-BSA

Tampon prêt à l'emploi, de 25 ml par flacon. Agiter avant emploi. Contient de l'azide de sodium (0,9 g/l).

Ce réactif est stable jusqu'à la date de péremption, conservé à 2-8°C, à l'abri de toute contamination.

Précautions :

- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage, avec leurs bouchons respectifs (capsule blanche pour le Facteur X (R1), la thromboplastine calcique (R2) et le tampon (R4) et capsule jaune pour le substrat Sxa-11 (R3)).
- Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination.
- Si le substrat jaunit, ceci indique la présence d'une contamination. Il doit être rejeté et un nouveau flacon doit être utilisé.

Nota :

- Les flacons R1, R2 et R3 sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.
- Suivant la méthode automatique utilisée, les réactifs peuvent être reconstitués avec des volumes différents de ceux indiqués. Dans tous les cas, les rapports respectifs de chaque réactif, R1, R2 et R3, préconisés dans la méthode manuelle (concentration finale dans le milieu réactionnel et volume total), doivent être respectés.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffrets. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage. Les réactifs R1, R2 et R3 sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

PREPARATION DES PLASMAS :

Le sang (9 volumes) doit être collecté, en tube plastique ou en verre silicé contenant du citrate trisodique 0,109M (1 vol.), par ponction veineuse franche, en évitant toute activation. Rejeter les premières gouttes de sang.

- Centrifuger le prélèvement, dans les 4 heures suivantes, pendant 20 minutes à 3000g, à une température inférieure ou égale à 18°C. Le plasma citraté doit être décanté dans un tube plastique.
- Conservation du plasma :
 - 8 heures à température ambiante (18-25°C).
 - 24 heures à 2-8°C.
 - 1 mois congelé à -20°C ou moins (avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 min. dans un bain marie à 37°C).

D.750.01/BI/1304



6580 Gove Court - Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

PROCEDURE :

Le coffret Biophen FVII est utilisé en méthode cinétique, automatisée, et peut être également utilisé en méthode manuelle, en « point final ». Les adaptations sur automates sont disponibles sur demande. Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405nm.

ETALONNAGE :

Utiliser un pool de plasma citratés normaux qui par définition titre 100% de facteur VII.
Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/1000. La dilution du plasma au 1/1000 représente par définition le taux 100% de facteur VII. La dilution au 1/500 représente 200% de facteur VII. La gamme d'étalonnage va de 0 à 200% de facteur VII.

Nota:

Alternativement, si la gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'un plasma calibrateur du commerce, de concentration (C) en Facteur VII précisément définie, la dilution au 1/1000 correspond à la concentration (C) en FVII indiquée, et le 1/500 à deux fois cette concentration. Pour un calibrateur titrant C, le taux de 200% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant ce calibrateur par le facteur suivant : $500 \times (C) / 100$.

Faire une pré-dilution du pool de plasma au 1/25 puis 1/20 (i.e. 1/500 final) en tampon Tris-BSA (R4), pour obtenir une dilution finale de 1/500 (soit 200% de facteur VII).

A partir de cette solution faire la gamme d'étalonnage suivante dans le diluant R4 :

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

MODE OPERATOIRE :

Méthode manuelle :

Diluer les plasmas à tester et les contrôles au 1/1000 en tampon Tris-BSA (R4).

Pour les concentrés thérapeutiques et les fluides biologiques où le facteur VII est recherché, cibler une concentration de facteur VII comprise entre 0,1 et 1 ng/ml dans la dilution finale (soit environ 20 à 200% de facteur VII selon ce protocole opératoire).

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

Réactifs	Microplaque	Tube plastique
Plasma dilué au 1/1000 ou étalon ou échantillon dilué	30 µl	100 µl
R2 : Thromboplastine calcique, Préincubée à 37°C	30 µl	100 µl
R1 : Facteur X Préincubé à 37°C	60 µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 7 minutes puis introduire :		
R3 : Substrat Sxa-11 Préincubé à 37°C	60 µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 5 minutes exactement		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (20g/L) ou 20% d'acide acétique	60 µl	200 µl
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

La couleur jaune obtenue est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui du test : Acide Citrique (20g/L), substrat Sxa-11, plasma dilué, Facteur X, thromboplastine calcique.

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

Méthode automatisée :

Les adaptations sur les divers automates présents sur le marché sont disponibles sur demande. Pour toute adaptation, les rapports respectifs des réactifs et du plasma testé, et le protocole général de la méthode manuelle doivent être respectés.

Nota:

- Suivant les méthodes, si des volumes plus ou moins importants doivent être utilisés, respecter très exactement le rapport des volumes et des concentrations des différents réactifs constituant le milieu réactionnel.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

RESULTATS :

Pour la méthode en point final, tracer en coordonnées bilogarithmiques, la droite étalon en portant en ordonnées la DO à 405 et en abscisses le taux de facteur VII (en %).

La concentration de facteur VII dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en %.

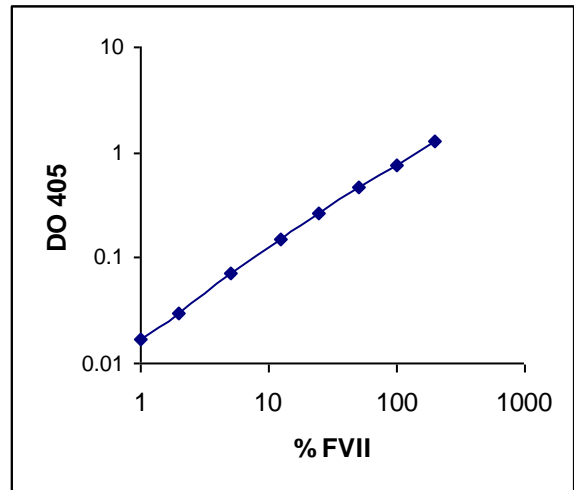
- En technique automatique, les taux sont directement calculés par l'instrument en fonction des valeurs de l'étalonnage.
- La zone de mesure va de 5 à 200 %.

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 obtenu est le taux mesuré, multiplié par le facteur de dilution « D » utilisé et divisé par 1000, soit D/1000.

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage ci-dessous est donnée à titre d'exemple. N'utiliser que la courbe générée pour la série de dosages réalisés.



PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES :

La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le « taux apparent » de facteur VII, correspondant à la DO moyenne obtenue pour un taux réactionnel sans facteur VII incrémenté de 3 écart-types. Cette limite de détection est de $\leq 5\%$.

REFERENCES :

1. Seligsohn U, Osterud B, Rapaport SI. Coupled amidolytic assay for factor VII : its use with a clotting assay to determine the activity of factor VII Blood 52(5) : 978-88 ; 1978.
2. Avvisati G, ten Cate JW, van Wijk EM, Dahle LH, Mariani G. Evaluation of a new chromogenic assay for factor VII and its application in patients on oral anticoagulant treatment. Br J Haematol 45(2): 343-52; 1980.
3. Poller L, Thomson HM, Bodzenta A, Easton AC, Latallo ZS, Chmielewska J. An assessment of an amidolytic assay for factor VII in the laboratory control of oral anticoagulants. Br J Haematol 49(1): 69-75; 1981.
4. van Dieijen-Visser MR, van Wersch J, Brombacher PJ, Rosing J, Hemker HC, van Dieijen G. Use of chromogenic peptide substrates in the determination of clotting factors II, VII, IX and X in normal plasma and in plasma of patients treated with oral anticoagulant. Haemostasis 12(3): 241-55; 1982.
5. Clarke BJ, Ofusu FA, Sridhara S, Bona RD, Rickles FR, Blajchman J. The first epidermal growth factor domain of human coagulation factor VII is essential for binding with tissue factor. FEBS Lett 298(2-3): 206-10; 1992.
6. Ledwozyw A, Jablonka S, Tusinska E, Herbut M. The estimation of factor VII in livestock plasma of domestic animals by the use of tripeptide chromogenic substrate. Arch Vet Pol 33(1-2): 123-7; 1993.
7. van Wersch JW. A chromogenic assay for coagulation factor VII: analytical performance characteristics and application in several diseases. Int J Clin Lab Res 23(4): 221-4; 1993.
8. Davies IE, Ubachs HM, van Wersch JW. The behaviour of amidolytic factor VII in smoking and non-smoking pregnant women in relation to their gestational age. Acta Obstet Gynecol Scand 76(5): 405-8; 1997.
9. Topper MJ, Prasse KW. Chromogenic assays for equine coagulation factors VII, VIII, IX and X, and C1-esterase inhibitor. Am J Vet Res 59(5): 538-41; 1998.
10. Chang YJ, Hamaguchi N, Chang SC, Ruf W, Shen MC, Lin SW. Engineered recombinant factor VII Q217 variants with altered inhibitor specificities. Biochemistry 28(34): 10940-8; 1999.