



HEMOCLOT VII-X

ACK051K

Measurement of Factor VII + X with a clotting method

For in vitro use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision : 12/03/2009

1. Intended use:

The **HEMOCLOT VII-X** kit is proposed for the measurement of Factors VII+X activity in human citrated plasma using a clotting method, triggered with calcium thromboplastin.

2. Assay principle:

The **HEMOCLOT VII-X** method is a clotting assay where all the extrinsic pathway clotting factors are present and in excess, excepted for factors VII and X, which are brought by the diluted tested plasma, and thromboplastin.

Factors VII and X are the limiting factors and clotting time is inversely proportional to the concentration of factors VII and X. There is an inverse linear relationship, on a bilogarithmic graph paper, between the factor VII-X concentration and the corresponding clotting time.

3. Assay specimen:

Human plasma obtained from Trisodium Citrate anticoagulated blood.

4. Reagents:

Each kit contains:

- 6 vials of 1 ml of **HEMOCLOT VII-X** reagent, a clotting mixture containing highly purified bovine prothrombin, fibrinogen and Factor V, lyophilized in presence of preservatives and stabilizers.

5. Reagents and material required, but not supplied:

- Pipettes with dispensing volumes of 20 µl, 50 µl and 100 µl.
- Pipette with a variable dispensing volume from 50 µl to 1,000 µl.
- Semi-automatic or automatic coagulation instrument, or fibrometer or electromagnetic water bath.
- Distilled water.
- Owren Koller buffer (# AAR003A/AAR003K).
- Normal pool human plasma or Factors VII + X calibrator (BIOPHEN Plasma Calibrator - # A222101).
- Normal and Abnormal control plasmas, titrated for factors VII+X, (BIOPHEN Normal Control Plasma - #A223201 and BIOPHEN Abnormal Control Plasma - #A223301).
- Calcium Thromboplastin (such as rabbit brain thromboplastin).

6. Reagent preparation and stability:

In their original package, and before any use, when stored at 2-8°C, the **HEMOCLOT VII-X** reagent is stable until the expiration date printed on the kit.

• Reagent Preparation:

Hemoclot VII-X: Restore the Hemoclot VII-X vial with 1 ml of distilled water; let for 15 min. at room temperature; mix gently until complete dissolution of the content.

• Reagent stability following reconstitution:

- 24 hours at room temperature (18-25°C).
- 72 hours at 2-8°C.
- 1 month frozen at -20° or below.

Nota: Source bovine plasma used for the extraction of proteins included in the preparation of **HEMOCLOT VII-X** were tested with registered methods and found negative for bovine infectious diseases, notably for the bovine spongiform encephalopathy. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of bovine origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

7. Sample collection and preparation:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M trisodium citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma must be tested within 8 hours when stored at room temperature (18-25°C), or can be used within 24 hours if kept at 2-8°C, or it can be frozen at -20°C or below for up to 6 months. Just before use, the plasma must be thawed for 15 min. in a water bath at 37°C. Thawed plasma must be used within 4 hours, at room temperature (18-25°C).

8. Protocol:

• Calibration curve:

Prepare 2 ml of normal citrated human pooled plasma **diluted 1:10** in Owren Koller buffer. By definition, this ten fold dilution of the normal citrated human plasma pool corresponds to a concentration of **100% of factors VII + X**. Using this preparation, the calibration curve is obtained as follows:

VII-X	0%	12.5%	25%	50%	100%
Dilution	0	1:80	1:40	1:20	1:10
Plasma pool 1:10	0 mL	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Owren Koller Buffer	1 mL	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

The calibration curve must be used within 4 hours at room temperature.

The calibration curve can also be established with the BIOPHEN Plasma Calibrator (#A222101), using the factor VII-X activity indicated on the flyer for the lot used.

• Preparation of tested plasma:

Tested plasma must be **diluted 1:10** in Owen Koller type buffer. The diluted plasma must be tested within 4 hours.

D.750.02/CK/051K



6560 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

• **Assay:**

Manual Method:

Preincubate Calcium Thromboplastin at 37°C.

In a test tube, or a cuvette, introduce:

- 100 µl of **HEMOCLOT VII-X** reagent.
- 100 µL of calibration solution or of tested plasma diluted **1:10**.

Incubate for 1 to 2 min. at 37°C, and then introduce:

- 150 µl of Calcium Thromboplastin preincubated at 37°C.

Record the clotting time.

Automatic Method:

The assay can be used with the semi-automatic or automatic instruments, such as ACL, STA, STA-R, KC-4, KC-10, BCT, BCS, etc...

The usual program used for testing the factors involved in the extrinsic pathway with a clotting based calcium thromboplastin method, and a specific deficient plasma, can be applied. The respective specimen and reagent volume ratios indicated for the manual method must be strictly respected. Usually, with automatic methods the volumes used for reagents and tested plasma (diluted 1:10) are half those recommended for the normal method.

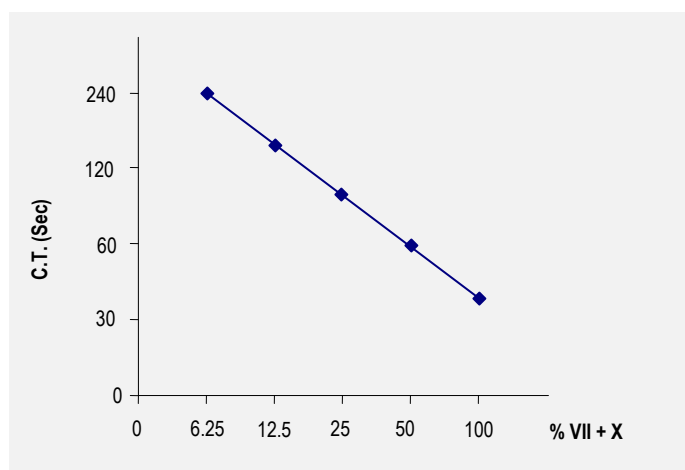
With semi automatic or automatic instruments, especially those with a photometric detection of clot formation, clotting times use to be slightly shorter than with the manual method.

9. Expression of results:

On a bilogarithmic graph paper, plot on abscissae the VII + X concentrations and on ordinates the corresponding clotting times. On the calibration curve obtained, interpolate directly the corresponding VII+X concentration for the tested plasma.

Example of Calibration curve:

This calibration curve is indicated as an example only. It was obtained with Calcium Thromboplastin (Calcic Thromboplastin) from Biomerieux (69-Marcy-l'Etoile-France), using a manual method.



10. Interferences:

The **HEMOCLOT VII-X** reagents **do not contain heparin inhibitors**. Presence of heparin or of other anti-thrombin or anti-Xa substances may interfere in the assay and prolong the clotting time.

However, current Calcium Thromboplastin preparations use to contain an heparin inhibitor. The assay is then insensitive to the presence of heparin. If any risk of interference of heparin must be avoided, check that the Calcium Thromboplastin used contains an heparin inhibitor. However, heparin inhibitors, present in thromboplastin preparations, are not always totally efficient for neutralizing Low Molecular Weight Heparin (LMWH).

11. Normal values:

Normal values for factors VII + X activity are usually > 70%.

12. Applications:

The **Hemoclot VII-X** reagent is proposed for measuring factors VII+X, altogether, in any clinical situation where one or both of these factors can be deficient.

The major applications are:

- Vitamin K deficiency (hepatic diseases, primary biliary cirrhosis, deficiency in new-borns, antibiotherapy, ...)
- Vitamin K antagonists (dicoumarol therapy, ...)
- Isolated deficiencies of factors VII or X.
- Accelerated clotting factor consumption (DIC)

13. Assay variations:

The clotting times observed for this assay are obtained with Calcium Thromboplastin from Biomerieux (Calcic Thromboplastin) or from Diagnostica Stago (Neoplastin). They are in the range from 25 to 35 seconds for the 100% VII+X concentration. Higher clotting times are obtained with other thromboplastins, such as PT-Fibrinogen, from IL. The assay performances can slightly vary according to the thromboplastin reagent type and lot, and the instrument used in the laboratory. Performances, as well as target values and acceptance ranges for each new lot of quality controls used, must then be confirmed (and adjusted if necessary) in the laboratory working conditions.

14. References:

1. Soulier JP, Larrieu MJ. Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosage de prothrombine, de proconvertine et de proaccélélerine. Sang 1952 ; 23: 549-559.
2. Favre-Gilly J, Belleville J, Croizat P, Revel L. Les états hémorragiques acquis par trouble plasmatique de coagulation. Cah Med Lyonnais 1967 ; 43 (28) : 2611-2668.
3. Gjonnaess H, Fagerhol MK. Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy. Acta Obste Gynecol Scand 1975; 54: 363-367.
4. Andrew M, Paes B, Milner R, Hohnston M, Mithell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987; 70: 165-172.



HEMOCLOT VII-X

ACK051K

Mesure des Facteurs VII + X par méthode coagulante

Pour utilisation in vitro exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 12/03/2009

1. Utilisation :

Le coffret **HEMOCLOT VII-X** est proposé pour la détermination de l'activité des Facteurs VII+X présents dans le plasma humain. C'est une méthode coagulante, utilisant la thromboplastine calcique.

2. Principe :

La technique proposée avec le coffret **HEMOCLOT VII-X** est basée sur une méthode de coagulation où tous les facteurs de la voie extrinsèque sont présents et en excès, à l'exception des facteurs VII et X, qui sont apportés par le plasma à tester, dilué, et de la thromboplastine.

Les facteurs VII et X sont alors les facteurs limitants. Le temps de coagulation obtenu avec le test est inversement proportionnel à la concentration des facteurs VII et X. Il en résulte une relation linéaire inverse, en coordonnées bilogarithmiques, entre la concentration en facteurs VII et X et le temps de coagulation correspondant.

3. Echantillon :

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.

4. Réactifs :

Chaque coffret contient :

- 6 flacons de 1 ml de réactif **HEMOCLOT VII-X**, réactif de coagulation contenant de la prothrombine bovine hautement purifiée, du fibrinogène et du facteur V bovins, lyophilisés en présence de conservateurs et de stabilisants.

5. Matériel nécessaire et non fourni :

- Pipettes à volume fixe de 20 µl, 50 µl et 100 µl.
- Pipette à volume variable de 50 µl à 1000 µl.
- Appareils de coagulation semi-automatiques ou automatiques, fibromètre ou Bain-Marie électromagnétique le cas échéant.
- Eau distillée.
- Tampon Owren Koller (Réf. AAR003A/AAR003K).
- Plasma normal (ou pool de plasma normal) ou calibrateur pour Facteurs VII + X (BIOPHEN Plasma Calibrator - Réf. A222101).
- Plasma de contrôle Normal et Abnormal titré en VII+X (BIOPHEN Normal Control Plasma – Réf. A223201 et BIOPHEN Abnormal Control Plasma – Réf. A223301).
- Thromboplastine calcique (comme la thromboplastine extraite de cerveau de lapin, par exemple).

6. Préparation, conservation et stabilité des réactifs :

Dans leur emballage d'origine, et avant toute utilisation, conservé à 2-8°C, le réactif **HEMOCLOT VII-X** est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

• Préparation du réactif :

Hemoclot VII-X : reconstituer le réactif Hemoclot VII-X avec 1 ml d'eau distillée, et laisser la galette se dissoudre totalement pendant au moins 15 min. à température du laboratoire. Agiter délicatement pour homogénéiser totalement le réactif.

• Stabilité du réactif après reconstitution :

- 24 heures à température du laboratoire (18-25°C).
- 72 heures à 2-8°C.
- 1 mois congelé à -20°C ou moins

Nota: Les plasmas bovins utilisés pour la purification des protéines rentrant dans la préparation du réactif **HEMOCLOT VII-X** ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts de toute trace de maladie infectieuse bovine, et notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine. 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.

7. Prélèvement :

Le sang (9 vol.) doit être prélevé sur du citrate trisodique 0.109M (1 vol.); le plasma est obtenu par décantation du surnageant après 20 min. de centrifugation à 2,500 g.

Le plasma citraté doit être utilisé :

- Dans les 8 heures s'il est maintenu à température du laboratoire (18-25°C),
- Dans les 24 heures, s'il est à 2-8°C,
- Il peut-être conservé congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 6 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 4 heures à température du laboratoire (18-25°C).

8. Protocole :

• Gamme d'étalonnage :

Préparer 2 ml de pool de plasma normal citraté dilué au 1:10 en tampon Owren Koller. Par définition, la dilution au 1:10 de pool de plasma normal citraté correspond à la concentration de **100% de facteurs VII + X**. Utiliser cette dilution au 1:10 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante :

VII-X	0%	12,5%	25%	50%	100%
Dilution	0	1:80	1:40	1:20	1:10
Pool de plasma 1:10	0 mL	0,125 mL	0,250 mL	0,500 mL	1 mL
Tampon Owren Koller	1 mL	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée avec le BIOPHEN Plasma Calibrator – Réf. A222101 en utilisant le taux indiqué pour les facteurs VII + X du lot utilisé.

D.750.01/CK/051K



8580 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

La gamme d'étalonnage ainsi préparée est stable pendant 4 heures à température du laboratoire.

• **Plasmas à tester :**

Diluer le plasma au **1:10** en tampon type Owen Koller. Le plasma dilué doit être utilisé dans les 4 heures.

• **Test :**

Méthode Manuelle :

Préincuber la thromboplastine calcique à 37°C.

Dans un tube à hémolyse, ou une cuvette réactionnelle, introduire:

- 100 µl de réactif **HEMOCLOT VII-X**.
- 100 µL de point d'étalonnage ou de plasma à tester dilué au **1:10**.

Incuber pendant 1 à 2 min. à 37°C, puis introduire:

- 150 µl de thromboplastine calcique préincubée à 37°C.

Noter le temps de coagulation.

Méthode automatique :

Le test peut être réalisé sur les instruments de coagulation semi-automatiques ou automatiques, comme : ACL, STA, STA-R, KC-4, KC-10, BCT, BCS, etc...

Le programme habituel utilisé pour tester les facteurs de la voie extrinsèque par méthode coagulante utilisant de la thromboplastine calcique, et un plasma déficient, peut être appliqué. Cependant, le rapport respectif des volumes indiqué pour la méthode manuelle doit être strictement respecté. En règle générale, par méthode automatique les volumes de réactifs utilisés et de prise d'essai sont la moitié de ceux utilisés pour la méthode manuelle.

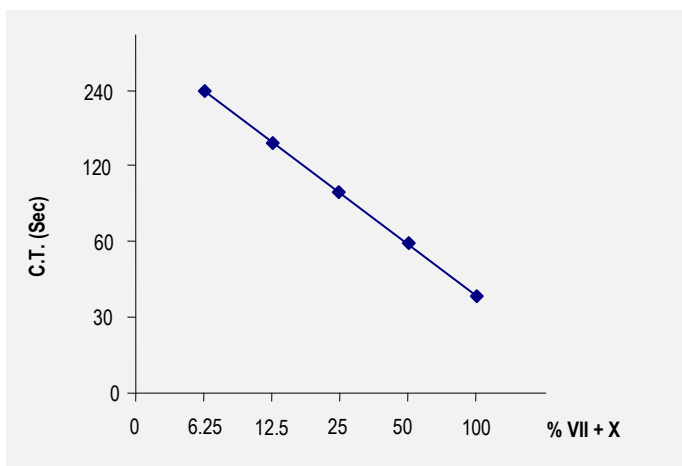
Sur automates (en particulier avec détection optique), les temps de coagulation sont légèrement plus courts que par méthode manuelle.

9. Expression des résultats :

Tracer la droite d'étalonnage sur papier bilogarithmique, en portant en abscisses les concentrations de VII + X et en ordonnées les temps de coagulation correspondants. En fonction du temps de coagulation du plasma à tester, en déduire le taux en Facteurs VII + X.

Exemple de courbe de calibration :

La courbe d'étalonnage ci-dessous n'est montrée qu'à titre d'exemple. Elle est obtenue en utilisant de la thromboplastine calcique (Calcic Thromboplastin) de Biomérieux (69-Marcy-l'Etoile-France), et avec la méthode manuelle (Bain-Marie électromagnétique).



10. Interférences :

Le réactif **HEMOCLOT VII-X** ne contient pas d'inhibiteurs de l'héparine. La présence d'héparine ou de toute autre substance anti-thrombine, ainsi que de toutes molécules anti-Xa, peut interférer dans le test et allonger les temps de coagulation.

Les préparations usuelles de Thromboplastine calcique utilisées contiennent un inhibiteur de l'héparine. De par la présence d'un inhibiteur de l'héparine dans la majorité des thromboplastines calciques commerciales, le test est alors insensible à la présence d'héparine. Cependant les inhibiteurs de l'héparine contenus dans les préparations de thromboplastine calcique ne sont pas toujours totalement efficaces pour neutraliser les héparines de bas poids moléculaires.

11. Valeurs usuelles

Les valeurs normales du facteur VII + X sont habituellement > 70 %.

12. Applications :

Le réactif **Hemoclot VII-X** est recommandé pour la mesure des facteurs VII+X, simultanément, dans tout état clinique où l'un de ces deux facteurs peut être diminué.

Les principales applications sont :

- Déficit en vitamine K (atteinte hépatique, colestase biliaire, déficit chez les nouveaux nés, antibiothérapie, ...)
- Traitement par les anti-vitamine K (Dicoumarol, Warfarine, ...)
- Déficits isolés en facteurs VII ou X.
- Coagulation Intra Vasculaire Disséminée (CIVD)

13. Variations :

Les temps de coagulation observés avec ce test sont obtenus avec de la thromboplastine calcique de chez Biomérieux (Calcic Thromboplastin) ou de Diagnostica Stago (Neoplastin). Ils sont de l'ordre de 25 à 35 secondes pour la concentration de 100% en facteurs VII+X. Des temps de coagulation plus longs sont obtenus avec d'autres thromboplastines, comme la PT-Fibrinogen, de IL. Les performances du test peuvent varier légèrement selon le type, le lot de thromboplastine et l'automate utilisés. Ces performances, ainsi que les valeurs cibles et intervalles de confiance, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé, doivent, par conséquent, être confirmés (et ajustés si nécessaire), dans les conditions de travail exactes du laboratoire.

14. References :

1. Soulier JP, Larrieu MJ. Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosage de prothrombine, de proconvertine et de proaccélélerine. Sang 1952 ; 23: 549-559.
2. Favre-Gilly J, Belleville J, Croizat P, Revel L. Les états hémorragiques acquis par trouble plasmatique de coagulation. Cah Med Lyonnais 1967 ; 43 (28) : 2611-2668.
3. Gjonnaess H, Fagerhol MK. Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy. Acta Obste Gynecol Scand 1975; 54: 363-367.
4. Andrew M, Paes B, Milner R, Hohnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987; 70: 165-172.