



HEMOCLOT FVII reagent

ACK081K

Measurement of Factor VII activity with a clotting method

For in vitro diagnostic use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision : 25/08/2008

1. Intended use:

The HEMOCLOT FVII reagent kit is proposed for the measurement of Factor VII clotting activity in human citrated plasma using a clotting method, triggered with calcium thromboplastin.

2. Assay principle:

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

Factor VII is the limiting factor and clotting time is inversely proportional to the factor VII concentration. There is an inverse linear relationship, on a bilogarithmic graph paper, between the factor VII concentration and the corresponding clotting time.

3. Assay specimen:

Human plasma prepared from Trisodium Citrate anticoagulated blood.

4. Reagents:

Each kit contains 6 vials of 1 ml of HEMOCLOT FVII (Def.) reagent, a clotting mixture containing purified bovine Fibrinogen and Factor V, human Prothrombin and Factor X, 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 human plasma pool or Factor VII calibrator (BIOPHEN Plasma Calibrator - # A222101).
- Normal and Abnormal control plasmas, titrated for factor VII, (BIOPHEN Normal Control Plasma - #A223201 and BIOPHEN Abnormal Control Plasma - #A223301).
- Calcium Thromboplastin (such as rabbit brain thromboplastin).

6. Reagent preparation and stability:

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

Note: The stability studies at 30°C show that all the reagents can be shipped at room temperature without damage.

– Reagent Preparation:

Restore the vial with 1 ml of distilled water; mix gently until complete dissolution of the content (vortex), let for 15 min. at room temperature(18-25°C); homogenize before each use.

• 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.

Note:

In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use.

Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination during use.

Vials are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any loss of powder when opening the vials.

Proteins were prepared from human plasma, which was tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBs Ag and HVC antibodies. Bovine Serum Albumin (BSA) and proteins were prepared from bovine plasma, which was tested for the absence of infectious agents, and collected from animals free from BSE. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of biological 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 4 hours when stored at room temperature (18-25°C), or can be rapidly frozen at -20°C or below for up to 1 month. Just before use, the plasma must be thawed for 15 min. in a water bath at 37°C.

Refer to GEHT or NCCLS guidelines for further instructions on specimen collection, handling and storage. Discard any sample with an unusual aspect.

8. Protocol:

• Calibration curve:

Prepare 2 ml of normal citrated human plasma pool 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 factor VII. Using this preparation, the calibration curve is obtained as follows:

VII	6.25%	12.5%	25%	50%	100%
Dilution	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
Plasma pool 1:10	0.060 mL	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Owren Koller Buffer	0.900 mL	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0 mL

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

The calibration curve must be used within 2 hours at room temperature.

• Preparation of tested plasma:

Tested plasma must be diluted 1:10 in Owen Koller type buffer. The diluted plasma must be tested within 2 hours.

Caution : to ensure optimal performances of the assay, perform all assays (calibration, samples, controls) extemporaneously and successively without interruption

D.750.02/CK/081K



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

• **Assay:**

Manual Method:

Preincubate Calcium Thromboplastin at 37°C.

In a test tube, or a cuvette, introduce:

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

Incubate for 1 min. at 37°C, and then introduce (starting the stop watch):

- 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 STA-R, KC-4, KC-10, etc...

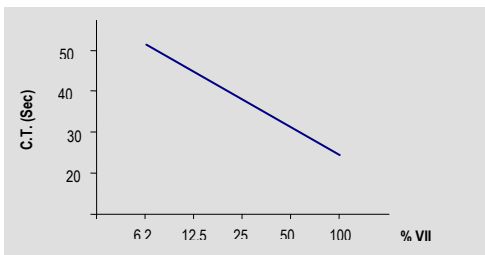
The usual program used for testing the factors involved in the extrinsic pathway with a clotting based calcium thromboplastin method, and a specific deficient plasma, can be applied. The respective specimen and reagent volume ratios indicated for the manual method must be strictly respected. Usually, 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 abscissa the FVII concentrations and on ordinates the corresponding clotting times. On the calibration curve obtained, interpolate directly the corresponding VII concentration for the tested plasma.

Example of Calibration curve: This calibration curve is indicated as an example only. It was obtained with Neoplastin CI5 from Diagnostica Stago, using a manual method.



10. Quality Control:

Use of quality control plasmas allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity of the assay from run to run, and from series to series, when using a same lot of reagents. Various control plasmas are available:

BIOPHEN Normal Control Plasma: (ref A223201);

BIOPHEN Abnormal Control Plasma: (ref A223301).

Each laboratory should verify and validate its own target value and acceptance range, for each new lot of quality control used, according to the instrument used and in the laboratory working conditions.

11. Cautions and limitations:

The **HEMOCLOT FVII reagent does 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).

Sampling must be performed with great care, avoiding any blood activation. Discard any plasma presenting an unusual aspect, or any sign of activation or clotting.

It is recommended to perform all assays of fresh calibration points, specimen and controls successively without interruption, to obtain optimal performances of the assay.

For a better accuracy, samples measured $\leq 10\%$ can be tested at the 1:5 dilution, and obtained results divided by 2; for samples measured $>100\%$ (or C%), the 1:20 dilution can be used and obtained results multiplied by 2.

For a deficient sample: check the result by testing if necessary the 1:5 dilution (the obtained concentration must then be divided by 2), and/or another sample and/or method for the patient plasma; check potential associated factor(s) deficiency.

Thrombin inhibitors present in the tested sample may lead to an underestimation of the FVII concentration

Do not store the plasma at 2-8°C.

12. Normal values:

Normal values for factor VII activity are usually $> 60\%$.

13. Applications:

The **Hemoclot FVII reagent** is proposed for measuring factor VII in any clinical situation where it 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 factor VII.
- Accelerated clotting factor consumption (DIC)

14. Assay variations:

The clotting times observed for this assay are obtained with Calcium Thromboplastin from Biomérieux/Trinity Biotech (Calcic Thromboplastin) or from Diagnostica Stago (Neoplastin CI5). They are in the range from 20 to 30 seconds for the 100% VII concentration. Clotting times can vary according to the type of thromboplastin used. 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.

15. 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 FVII reagent

ACK081K

Mesure de l'activité du Facteur VII par méthode coagulante

A usage diagnostic in vitro exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision 25/08/2008

1. Utilisation :

Le coffret HEMOCLOT FVII reagent est proposé pour la détermination de l'activité coagulante du Facteur VII présent dans le plasma humain. C'est une méthode coagulante, utilisant la thromboplastine calcique.

2. Principe :

La technique proposée avec le coffret HEMOCLOT FVII reagent est basée sur une méthode de coagulation où tous les facteurs de la voie extrinsèque sont présents et en excès, à l'exception du facteur VII, qui est apporté par le plasma à tester, dilué, et de la thromboplastine.

Le facteur VII est alors le facteur limitant. Le temps de coagulation obtenu avec le test est inversement proportionnel à la concentration de facteur VII. Il en résulte une relation linéaire inverse, en coordonnées bilogarithmiques, entre la concentration en facteur VII 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 FVII (Def.) reagent, réactif de coagulation contenant du fibrinogène et du facteur V bovins, de la prothrombine et du Facteur X humains, purifiés, 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 calibre pour Facteur VII (BIOPHEN Plasma Calibrator - Réf. A222101).
- Plasmas de contrôle Normal et Anormal titrés en FVII (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 l'emballage d'origine, et avant toute utilisation, conservé à 2-8°C, le réactif HEMOCLOT FVII reagent est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

Remarque : Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

• Préparation du réactif :

Reconstituer le réactif avec 1 ml d'eau distillée, homogénéiser jusqu'à dissolution complète du contenu (vortex), et laisser stabiliser pendant

au moins 15 min. à température du laboratoire (18-25°C). Agiter délicatement pour homogénéiser totalement le réactif, avant chaque utilisation.

• 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:

Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage avec leurs bouchons respectifs.

Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination.

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

Le plasma humain utilisé pour la préparation des protéines rentrant dans la préparation du réactif a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VCH. Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA et des protéines rentrant dans la préparation du réactif a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, tout produit d'origine biologique doit être manipulé 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 4 heures s'il est maintenu à température du laboratoire (18-25°C),
- Il peut-être conservé rapidement congelé, à -20°C ou moins, jusqu'à 1 mois. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C.

Se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons.

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 facteur VII. Utiliser cette dilution au 1:10 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante :

VII	6.25%	12.5%	25%	50%	100%
Dilution	1:160	1:80	1:40	1:20	1:10
Pool de plasma 1:10	0.060 mL	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Tampon Owren Koller	0.900 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 le facteur VII du lot utilisé.

La gamme d'étalonnage ainsi préparée est stable pendant 2 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 2 heures.

Précaution : dans la mesure du possible, pour obtenir les performances optimales du dosage, tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) seront réalisés extemporanément et simultanément.

D.750.01/CK/081K



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

- **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 FVII reagent**.
- 100 µL de point d'étalonnage ou de plasma à tester dilué au 1:10.

Incuber pendant 1 min. à 37°C, puis introduire (en déclenchant le chronomètre):

- 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 : STA-R, KC-4, KC-10, etc...

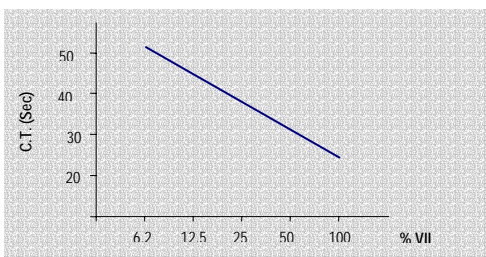
Le programme habituel utilisé pour tester les facteurs de la voie extrinsèque par méthode coagulante utilisant de la thromboplastine calcique, et un plasma déficient, peut être appliqué. Cependant, le rapport respectif des volumes indiqué pour la méthode manuelle doit être strictement respecté. En règle 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 et en ordonnées les temps de coagulation correspondants. En fonction du temps de coagulation du plasma à tester, en déduire le taux en Facteur VII.

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 Neoplastine C15 de Diagnostica Stago, et avec la méthode manuelle (Bain-Marie électromagnétique).



10. Contrôle de qualité :

L'utilisation de plasmas de contrôle permet de vérifier la bonne pratique du dosage et la réactivité homogène de série à série. Les plasmas de contrôle suivants peuvent être utilisés :

Biophen Normal Control Plasma (#A223201).

Biophen Abnormal Control Plasma: (#A223301).

Chaque laboratoire devra vérifier et valider ses propres valeurs cibles et intervalles d'acceptation, selon l'instrument, et dans les conditions de travail exactes du laboratoire, pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé.

11. Limites et interférences :

- Le réactif **HEMOCLOT FVII reagent** 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.

- Le prélèvement doit être effectué avec soin, en adhérant strictement aux précautions requises, pour éviter toute activation sanguine. Rejeter tout prélèvement suspect, ou présentant un signe d'activation ou de coagulum.

- Il est recommandé de tester successivement et sans interruption la gamme de calibration fraîchement préparée, les échantillons à tester et les contrôles, pour obtenir les performances optimales du test.

- Pour une meilleure précision des résultats, pour un échantillon mesuré $\leq 10\%$, utiliser la dilution 1:5 et diviser le taux ainsi obtenu par 2 ; pour un échantillon mesuré $> 100\%$ (ou C %) utiliser la dilution 1:20 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2.

- Pour un échantillon mesuré déficient : vérifier le résultat en testant si nécessaire la dilution 1/5 (le taux obtenu sera divisé par 2), et/ou sur un autre prélèvement et/ou une autre méthode ; vérifier l'éventuelle présence d'un déficit combiné avec d'autre(s) facteur(s).

- La présence d'inhibiteurs de la thrombine dans l'échantillon est susceptible d'entraîner une sous estimation du taux de FVII.

- Ne pas conserver le plasma à 2-8°C.

12. Valeurs usuelles

Les valeurs normales du facteur VII sont habituellement $> 60 \%$.

13. Applications :

Le réactif **Hemoclot FVII Reagent** est recommandé pour la mesure du facteur VII, dans tout état clinique où il 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 facteur VII.
- Coagulation Intra Vasculaire Disséminée (CIVD)

14. Variations :

Les temps de coagulation observés avec ce test sont obtenus avec de la thromboplastine calcique de Biomérieux/Trinity Biotech (Calcic Thromboplastin) ou Diagnostica Stago (Neoplastin C15). Ils sont de l'ordre de 20 à 30 secondes pour la concentration de 100% en facteur VII. Les temps de coagulation obtenus peuvent varier selon le type de thromboplastine utilisé. 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.

15. References :

1. Soulier JP, Larrieu MJ. Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosage de prothrombine, de proconvertine et de proaccéléline. 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. Gjonjaess 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.