

FIBRINOGENO

Metodo basato sul tempo di Trombina



REF. 1004/L 2x5ml + 2x50ml (senza Calibratore e Controlli)

USO PREVISTO

Metodo per la determinazione quantitativa del fibrinogeno in plasma citrato.

PRINCIPIO

Il dosaggio del fibrinogeno nel tempo di coagulazione con trombina si basa sul metodo originariamente descritto da Clauss. In presenza di elevate concentrazioni di trombina, il tempo richiesto per la formazione del coagulo nel plasma diluito è inversamente proporzionale alla concentrazione di fibrinogeno.

CAMPIONE

Plasma in citrato trisodico al 3.2 % (0.109 M).

Evitare l'emolisi e la contaminazione da parte di liquidi tissutali. Centrifugare il sangue per 15 minuti a 1500 x g. Nel caso in cui i campioni siano mantenuti a una temperatura di 22 – 24°C, eseguire l'analisi entro 2 ore.

COMPONENTI FORNITI

Trombina Bovina (2 x 5 ml)	Trombina bovina tamponata	Trombina 100 NIH Unità/ml Albumina > 1% Conservanti > 1%
Tampone Imidazolo (2 x 50 ml)	Tampone Imidazolo in soluzione salina	Imidazolo > 10 mmol/L Conservanti < 1%

Opzionale:

Calibratore Fibrinogeno REF. 1006 (5x1 ml)	Plasma umano raccolto con anticoagulante al citrato di sodio
Control Plasma N REF. 1007 (5x1 ml)	Plasma umano raccolto con anticoagulante al citrato di sodio < 0.4 %
Control Plasma P REF. 1008 (5x1 ml)	Plasma umano raccolto con anticoagulante al citrato di sodio < 0.4 %

I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta se conservati ben chiusi a 2-8°C. Una volta aperti la stabilità dei reagenti è di 14 giorni.

Valori irregolari, alterazioni del colore del prodotto o perdita del vuoto nei flaconi di Trombina bovina, Calibratore o Controlli potrebbero indicare un deterioramento del prodotto. In ogni caso, prestazioni scadenti potrebbero essere dovute ad altri fattori legati al sistema di test.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

I reagenti sono pronti all'uso.

Ricostituire il Calibratore Fibrinogeno, il Control Plasma N e il Control Plasma P con 1.0 ml di acqua distillata. Agitare dolcemente e lasciare riposare per 15 minuti a temperatura ambiente. Non capovolgere o agitare con forza il flacone. Una volta eseguita correttamente la ricostituzione, calibratore e controlli si mantengono stabili rispettivamente per 2 e per 8 ore a 2-8°C.

È necessario che tutti i reagenti al momento dell'uso siano a temperatura ambiente.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Utilizzare le normali precauzioni richieste in laboratorio.

Il reagente può contenere componenti non reattivi e conservanti di varia natura. A scopo cautelativo è opportuno evitare il contatto con la pelle e l'ingestione. Utilizzare le normali precauzioni previste in laboratorio.

Smaltire i rifiuti secondo le norme locali vigenti.

PROCEDURA DEL TEST

Preparare diverse diluizioni (1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/40) del calibratore come riportato in tabella Tab. 1.

Tab.1. Curva di calibrazione.

	Calibratore Fibrinogeno	Tampone Imidazolo	Volume Totale
1/5	100 µl	400 µl	500 µl
1/10	100 µl	900 µl	1000 µl
1/15	100 µl	1400 µl	1500 µl
1/20	100 µl	1900 µl	2000 µl
1/40	100 µl	3900 µl	4000 µl

COMPANY WITH
QUALITY SYSTEM
ISO 9001 - ISO 13485
Certified by IMQ

GIESSE[®]
DIAGNOSTICS

Diluire i campioni e i controlli 1:10 con Tampone Imidazolo (50 µl + 450 µl).

Trattare Calibratori e Controlli come i campioni.

Campione prediluito	200 µl
Incubare 4-6 minuti a 37°C. Aggiungere:	
Trombina bovina	100 µl

Cronometrare il tempo di formazione del coagulo. Non preriscaldare la trombina.

Preparare sempre una nuova curva ad ogni cambio del lotto del reagente, della strumentazione oppure ogniqualvolta i controlli non rientrino più nei range stabiliti.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Tutti i calibratori devono essere fatti in duplicato.

Calcolare il valore medio dei duplicati dei tempi di coagulazione e costruire la curva di taratura riportando, su carta bilogarithmica, le concentrazioni delle varie diluizioni contro i corrispondenti tempi di formazione del coagulo.

Il plasma diluito 1:10 rappresenta il 100 % del valore assegnato. Il fattore di diluizione indica il rapporto che intercorre tra la diluizione 1:10 e le altre diluizioni.

Esempio: Calibratore Fibrinogeno = **286 mg/dl** (ciascun laboratorio è tenuto a preparare le curve con i propri reagenti e la propria strumentazione).

Diluizione	Fattore di diluizione	Fibrinogeno (mg/dl)
1:5	10/5 = 2	286x2 = 572
1:10	10/10 = 1	286x1 = 286
1:15	10/15 = 0,67	286 x 0,67 = 191.6
1:20	10/20 = 0.5	286x0.5 = 143
1:40	10/40 = 0.25	286x0.25 = 71.5

Ricavare le concentrazioni di fibrinogeno del campione e dei controlli dalla curva di taratura.

LIMITAZIONI

1. Aggiungere immediatamente il sangue all'anticoagulante a base di citrato trisodico e miscelare delicatamente. **EDTA ed Eparina non sono adatti come anticoagulanti.**
2. L'emolisi può attivare il fattore di coagulazione ed interferire nel rilevamento del punto finale. I campioni itterici e lipemici potrebbero risultare inappropriati per i metodi di rilevamento del punto finale.
3. Il campione deve venire a contatto esclusivamente con superfici non umidificabili.
4. Il rapporto del sangue rispetto all'anticoagulante è generalmente pari a 9:1 e dà luogo a una concentrazione di citrato compresa tra 10.9 e 12.9 mmol/l. Nel caso di pazienti con ematocrito superiore al 55 % è necessario regolare tale concentrazione.
5. Il congelamento e lo scongelamento del plasma contenente cellule residue può danneggiare le membrane delle cellule compromettendo i risultati.
6. Gravi reazioni infiammatorie possono aumentare il fattore I circolante (fibrinogeno).
7. Un'elevata concentrazione di prodotti di degradazione del fibrinogeno (FDP) potrebbe prolungare i tempi di coagulazione soprattutto nel caso in cui il livello del fibrinogeno risulti inferiore a 150 mg/dl.
8. Nei pazienti con gravi anomalie qualitative del fibrinogeno, l'analisi del tempo di coagulazione della trombina potrebbe indicare un decremento del fibrinogeno. I risultati quantitativi del fibrinogeno potrebbero risultare normali sugli stessi campioni in caso di utilizzo di altri metodi.
9. L'eparina non interferisce sui livelli terapeutici. In ogni caso, livelli molto elevati di eparina potrebbero dare luogo a bassi valori del fibrinogeno. Se si sospetta una simile interferenza da parte dell'eparina, in luogo della trombina in questa analisi è possibile utilizzare l'enzima batroxobina.
10. Elevati livelli di paraproteina, anticorpi della trombina e farmaci in grado di attivare il sistema fibrinolitico possono interferire con l'analisi del fibrinogeno.

11. Il kit Fibrinogeno e i singoli componenti sono stati studiati per operare a 37°C. Accertarsi che tutti gli elementi riscaldanti funzionino correttamente.

VALORI ATTESI

Generalmente un intervallo di riferimento normale è:

150 – 350 mg/dl (1.5 – 3.5 g/l)

I valori indicati devono essere considerati solo come linea guida. Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire il proprio intervallo di riferimento.

PRESTAZIONI DEL METODO

Precisione: Sono state effettuate 20 determinazioni successive in tre giorni consecutivi utilizzando 3 campioni a diverse concentrazioni. E' stato riscontrato un CV percentuale pari a 1.37 % (basso), 0.96 % (normale) e 0.79 % (alto).

Correlazione con metodo di riferimento: $Y = 1.0082x - 3.4767$ $r = 0.9992$

BIBLIOGRAFIA

- 1- Hirsh J., Deykin D., Poller L.: Therapeutic Range For Oral Anticoagulant Therapy. Chest 89/12 (Suppl) 115-155, 1986.
- 2- International Committee For Standardization In Haematology And International Committee On Trombosis And Haemostasis. Amer. J. Clin. Path. 88:779 1985.
- 3- National Committee For Clinical Laboratory Standards: Collection, Transport And Processing Of Blood Specimens For Coagulation Testing And Performance Of Coagulation Assays, 1991. Nccls.
- 4 - Douketis Jd, Lane A, Milne J, Ginsberg Js. Trombosis Research, 1998; 92: 11-17.

FIBRINOGEN

Method based on Thrombin clotting time



REF. 1004/L 2x5ml + 2x50ml (without Calibrator and controls)

COMPANY WITH
QUALITY SYSTEM
ISO 9001 - ISO 13485
Certified by IMQ

GIESSE[®]
DIAGNOSTICS

INTENDED USE

Method for the quantitative determination of fibrinogen in citrated plasma.

PRINCIPLE

The thrombin clotting time fibrinogen assay is based on the method originally described by Clauss. In the presence of high concentrations of thrombin, the time required for clot formation in dilute plasma is inversely proportional to the fibrinogen concentration.

SAMPLE

Plasma in trisodium citrate 3.2 % (0.109 M).

Avoid hemolysis and contamination by tissue fluids. Centrifuge blood for 15 minutes at 1500 x g. Test within 2 hours if samples are held at 22-24°C.

KIT COMPONENTS

Bovine Thrombin (2 x 5 ml)	Buffered Bovine Thrombin	Thrombin 100 NIH Units/ml Albumin > 1% Preservative > 1%
Imidazole Buffer (2 x 50 ml)	Imidazole buffer in saline Sodium azide 0.2 g/l	Imidazole > 10 mmol/L Preservative < 1%

Optional:

Fibrinogen Calibrator REF. 1006 (1x1 ml)	Human plasma collected with sodium citrate anticoagulant
Control Plasma N REF. 1007 (1x1 ml)	Human plasma collected with sodium citrate anticoagulant < 0.4 %
Control Plasma P REF. 1008 (1x1 ml)	Human plasma collected with sodium citrate anticoagulant < 0.4 %

The reagents are stable until the expiration date indicated on the label if stored tightly closed at 2-8°C.

Erratic values, product color variations, or lack of vacuum in the vial of Bovine Thrombin, Calibrator or Controls could indicate product deterioration. However, poor control performance could also be due to other factors within the test system.

REAGENT PREPARATION

The reagents are ready to use.

Reconstitute the Fibrinogen Calibrator, Control Plasma N, and Control Plasma P with 1.0 mL of distilled water. Gently swirl and let stand for 15 minutes at room temperature. Do not invert or shake the vial vigorously. Once properly reconstituted, the calibrator and controls remain stable for 2 and 8 hours respectively at 2-8°C.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Use standard laboratory precautions.

The reagent may contain non-reactive components and various types of preservatives. As a precaution, avoid skin contact and ingestion. Use standard laboratory safety procedures.

Dispose of waste according to local regulations.

TEST PROCEDURE

Prepare various dilutions (1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/40) of the calibrator as shown in Table 1.

Table 1. Calibration curve:

	Fibrinogen Calibrator	Imidazole Buffer	Total Volume
1/5	100 µl	400 µl	500 µl
1/10	100 µl	900 µl	1000 µl
1/15	100 µl	1400 µl	1500 µl
1/20	100 µl	1900 µl	2000 µl
1/40	100 µl	3900 µl	4000 µl

Dilute the samples and controls 1:10 with Imidazole Buffer (50 µL + 450 µL).

Treat calibrators and controls in the same way as the samples.

Prediluted samples 200 µl

Incubate 4-6 minutes at 37°C. Add:

Bovine Thrombin 100 µl

Time clot formation. Do not prewarm thrombin.

The frequency of curve preparation is partially determined by the method of clot detection used. Always prepare a new curve with each change in reagent lots, instrumentation, or when controls no longer fall within established ranges.

RESULTS INTERPRETATION

Calculate the mean of duplicate clotting times and construct a log-log curve that plots fibrinogen concentration vs. clotting time.

Plasma diluted 1:10 represents 100 % of the assigned value. The dilution factor indicates the relationship between the 1:10 dilution and other dilutions.

Example: Fibrinogen Calibrator = **286 mg/dl** (each laboratory must prepare curves with their reagents and instrumentation).

Dilution	Dilution factor	Fibrinogen (mg/dl)
1:5	10/5 = 2	286x2 = 572
1:10	10/10 = 1	286x1 = 286
1:15	10/15 = 0.67	286x0.67 = 191.6
1:20	10/20 = 0.5	286x0.5 = 143
1:40	10/40 = 0.25	286x0.25 = 71.5

Find the clotting time of controls and patient samples on the curve and read the corresponding fibrinogen value.

LIMITATIONS

- Blood must be immediately added to trisodium citrate anticoagulant and gently mixed. **EDTA and Heparin are unsuitable anticoagulants.**
- Hemolysis can cause clotting factor activation and end point detection interference. Icteric and lipemic specimens may also be inappropriate for end point detection methods.
- The sample should only contact nonwettable surfaces.
- The ratio of blood to anticoagulant is usually 9:1 and results in a citrate concentration of 10.9 to 12.9 mmol/L. This concentration must be adjusted for patients with hematocrits above 55 %.
- Freezing and thawing of plasma that contains residual cells will generate damaged cell membranes that can affect results.
- Acute inflammatory reactions can elevate circulating Factor I (Fibrinogen).
- High Fibrinogen Degradation Products (FDP) may prolong clotting times, especially when the fibrinogen level is below 150 mg/dl.
- In patients with qualitative fibrinogen abnormalities, the thrombin clotting time assay may indicate decreased fibrinogen. The quantitative fibrinogen results may be normal on these same samples if tested by other methods.
- Heparin does not interfere at therapeutic levels. However, very high heparin levels may cause low fibrinogen results. Batroxobin enzyme can be substituted for thrombin in this assay if heparin interference is suspected.
- High paraprotein levels, thrombin antibodies, and drugs that activate the fibrinolytic system can interfere with fibrinogen assays.
- The kit Fibrinogen and individual components are designed to work at 37°C. Ensure that all heating elements are functioning properly.

EXPECTED VALUES

Generally the normal reference interval is:

150 – 350 mg/dl (1.5 – 3.5 g/l)

These values should only be used as a guideline. Each laboratory should establish own Reference Range.

PERFORMANCE

Precision: Twenty consecutive determinations were performed over three consecutive days using three samples at different concentrations. A percentage CV of 1.37% (low), 0.96% (normal), and 0.79% (high) was observed

Correlation with reference method: $Y = 1.0082x - 3.4767$ $r = 0.9992$

REFERENCES

- 1- Hirsh J., Deykin D., Poller L.: Therapeutic Range For Oral Anticoagulant Therapy. Chest 89/12 (Suppl) 115-155, 1986.
- 2- International Committee For Standardization In Haematology And International Committee On Trombosis And Haemostasis. Amer. J. Clin. Path. 88:779 1985.
- 3- National Committee For Clinical Laboratory Standards: Collection, Transport And Processing Of Blood Specimens For Coagulation Testing And Performance Of Coagulation Assays, 1991. Nccls.
- 4 - Douketis Jd, Lane A, Milne J, Ginsberg Js. Trombosis Research, 1998; 92: 11-17