

Kit per la determinazione del fibrinogeno - Metodo di Clauss



**Il reattivo R1 è classificato come Xn = nocivo
CONTIENE AZOTURO DI SODIO**

R22: nocivo per ingestione

R52/53: nocivo per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico

S36/37: usare indumenti protettivi e guanti adatti

S60: questo materiale e il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi

S61: nn disperdere nell'ambiente. Riferirsi alle istruzioni speciali/schede informative in materia di sicurezza

PRINCIPIO

Il kit FIBRINOGEN misura il Tempo di coagulazione, espressione esclusiva della quantità di fibrinogeno presente nel campione, secondo il metodo originario descritto da Clauss. In presenza di elevate concentrazioni di Trombina, il tempo richiesto per la formazione del coagulo nel plasma diluito, risulta inversamente proporzionale alla concentrazione de fibrinogeno.

Nota: la diluizione del plasma in esame serve a minimizzare l'interferenza di eventuali anticoagulanti quali l'eparina.

REATTIVI

R1 Tampone imidazolo pH 7.4

R2 Trombina bovina ~ 100 NIH unità/ml

R3 Plasma di controllo normale (N)

R4 Plasma di controllo patologico (P)

R5 Calibratore Fibrinogeno

CAMPIONI

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

- Effettuare il prelievo ed evitando emolisi e contaminazioni miscelare immediatamente il sangue con l'anticoagulante (9 volumi di sangue ed 1 volume di Citrato trisodico 3.2 %). Non utilizzare campioni che non raggiungono il volume del 90%.

- Centrifugare a 2500 x g per 15 minuti.

- Prelevare il sopranatante ed eseguire il test entro 2 ore se mantenuto tra 22 e 24 °C

Note



Il Calibratore (R5) ed i due Controlli di origine umana (R3 e R4) sono stati ottenuto utilizzando solo sangue di donatori risultati negativi con tests approvati dall'FDA per la rilevazione di HbsAg, HCV ed anticorpi anti HIV 1/2. Tuttavia, poiché nessun tests è in grado di assicurare che i prodotti derivanti da sangue umano non comportino rischi di trasmissione di agenti infettivi, è necessario considerare il prodotto comunque potenzialmente a rischio e conseguentemente manipolarlo con le stesse precauzioni che si usano per i campioni prelevati dai pazienti.

- Ogni qualvolta si manipolano agenti infettanti, reagenti chimici, reagenti di origine umana od animale, sangue o altri liquidi biologici, è consigliabile seguire le più comuni raccomandazioni e prendere tutte le necessarie precauzioni igieniche come l'utilizzazione di guanti monouso.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Il reattivo **R1** è liquido e pronto all'uso.

- Reattivo **R2:** ricostituire il contenuto di un flacone di Trombina bovina con 2 ml di acqua distillata. Agitare dolcemente fino a completa dissoluzione.

NOTA: Con strumentazione fotomeccanica si consiglia di ricostituire la Trombina bovina, anziché con l'acqua distillata, con 2 ml di Caolino (fornito separatamente).

- Reattivi **R3-R4-R5:** ricostituire con 1 ml di acqua distillata. Agitare dolcemente fino a completa dissoluzione e lasciar riposare, prima dell'uso, 15 minuti a temperatura ambiente.

Note

- E' indispensabile che al momento dell'uso tutti i reagenti siano a temperatura ambiente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit a 2-8°C.

- I reagenti, se adoperati e conservati secondo buona prassi di laboratorio, sono stabili fino alla scadenza riportata in etichetta.

- Il reattivo **R2** ricostituito è stabile 7 giorni a 2-8°C e 30 giorni se congelato entro 4 ore dalla ricostituzione; in tal caso, al momento dell'uso, scongelare rapidamente a 37°C. Non ricongelare.

- I reattivi **R3** e **R4** ed **R5** ricostituiti sono stabili 8 ore a 2-8°C.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Vedi i consigli di prudenza indicati accanto alla simbologia.

Attenzione: i reattivi contengono Sodio Azide (0.095%) come conservante. Evitare l'ingestione ed il contatto con pelle, occhi e mucose.

SMALTIMENTO RIFIUTI

Il prodotto deve essere smaltito secondo le locali normative in materia di gestione dei rifiuti.

PROCEDIMENTO

- Preparare, con il tampone imidazolo, 4 diluizioni scalari (1:5, 1:10, 1:15, 1:35) del calibratore e testarle come descritto in seguito.

Nota: 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

- Diluire il sovrinatante (campione in esame) e gli eventuali controlli di qualità (ricostituiti con tampone imidazolo, nel rapporto 1:10).

- Distribuire in altrettante provette in plastica ed eseguire i tests delle varie diluizioni del calibratore per fibrinogeno (con cui si costruirà la curva di riferimento), dei controlli e del campione, entrambi diluiti, seguendo quanto riportato nello schema:

Campione prediluito	200 µl
Incubare 4-6 minuti a 37°C ed aggiungere	
Trombina bovina	100 µl
All'aggiunta della Trombina cronometrare il tempo di formazione del coagulo (secondi).	

PREPARAZIONE DELLA CURVA DI TARATURA

- Costruire, su scala bilogartimica, la curva di taratura riportando in ascisse le concentrazioni (mg/dl) delle diluizioni scalari del calibratore per fibrinogeno ed in ordinate i corrispondenti tempi di formazione del coagulo.

Esempio: calibratore per fibrinogeno = 304 mg/dl

DILUIZIONE	FATTORE DI DILUIZIONE	CONCENTR. FIBRINOGENO (mg/dl)	TEMPO MEDIO DI COAGULAZIONE (sec)
1:5	10/5 = 2	304 x 2 = 608	6.6
1:10	10/10 = 1	304 x 1 = 304	12.3
1:15	10/15 = 0.67	304 x 0.67 = 204	18.6
1:35	10/35 = 0.29	304 x 0.29 = 88	24.2

- Ricavare le concentrazioni di fibrinogeno del campione e del controllo riportando sulla curva di taratura i loro tempi di coagulazione.

VALORI DI RIFERIMENTO

Generalmente l'intervallo di riferimento normale è compreso tra: 150- 350 mg/dl.

E' consigliabile comunque che ciascun laboratorio determini i propri valori di riferimento.

PRESTAZIONI DEL REATTIVO



Accuratezza

E' stato eseguito uno studio testando in più laboratori tre plasmi di controllo (valore basso, normale ed alto) con il FIBRINOGEN ed i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando reattivi di altre ditte.

I risultati sono di seguito sintetizzati:

N	CAMPIONE	FIBRINOGEN	N	ALTRI REAGENTI
10	Basso	144 mg/dl	196	163 mg/dl
10	Normale	294 mg/dl	196	297 mg/dl
10	Alto	488 mg/dl	390	474 mg/dl

Precisione

In giorni diversi sono stati analizzati con il reagente FIBRINOGEN e con strumentazione foto-ottica tre plasmi di cui il primo con valore di fibrinogeno basso, il secondo normale ed il terzo alto.

Ogni giorno sono state eseguite 10 curve standard per un totale di 30 curve.

I CV in % di ciascun plasma sono risultati:

5.9% per il plasma basso

3.4% per il plasma normale

2.9% per il plasma alto

Controllo di qualità

- E' opportuno unitamente al campione od almeno con ciascun gruppo di tests, al cambio del lotto e in occasione di importanti regolazioni della strumentazione eseguire anche un controllo normale ed uno patologico.

- Il controllo normale e patologico forniti nel kit corrispondono il primo ad un plasma normale liofilizzato, il secondo ad un plasma corretto al fine di simulare un plasma con deficit moderato.

LIMITAZIONI

- Il sangue deve essere unito all'anticoagulante immediatamente e deve essere miscelato dolcemente (NON UTILIZZARE EDTA ED EPARINA).

- L'emolisi può attivare il fattore di coagulazione ed interferire nel rilevamento del punto finale. I campioni itterici e lipemici e potrebbero risultare inappropriati per i metodi di rilevamento del punto finale.

- Il campione deve venire a contatto esclusivamente con superfici idrorepellenti.

- Il rapporto tra il sangue e l'anticoagulante è generalmente pari a 9:1 e da luogo ad una concentrazione di citrato compresa tra 10.9 e 12.9 mmol/l.

- Il congelamento e lo scongelamento del plasma contenente cellule residue può danneggiare le membrane della cellula alterando i risultati.

- Gravi reazioni infiammatorie possono aumentare il Fattore I circolante (Fibrinogeno).

- 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.

- 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 su gli stessi campioni in caso di utilizzo di altri metodi.

- L'eparina non interferisce sui livelli terapeutici. In ogni caso livelli molto elevati di eparina potrebbero dare luogo a bassi valori di fibrinogeno. Se si sospetta una simile interferenza da parte dell'eparina in luogo della Trombina è possibile utilizzare l'enzima batroxobina.

- Elevati livelli di paraproteina, anticorpi della trombina e farmaci in grado di attivare il sistema fibrinolitico possono interferire con l'analisi del fibrinogeno.

BIBLIOGRAFIA

Clauss A.: Acta Haemat 17, 237-246 (1957)

NCCLS: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays; 2nd edition Approved Guideline. NCCLS document H21-A3, Wayne PA. (1998)

NCCLS: Procedure for determining fibrinogen in plasma. Approved guideline. NCCLS Document H30-A2. Wayne, PA, (2001)

Musgrave K. A., Bick R.L.: Qualità assurance in the Haemostasis Laboratory. In Bick R.L. et al. Editors: Hematology: Clinical and Laboratory Practice Vol. 2, 1309 - 1315, Mosby St. Louis MO (1993)

SIMBOLOGIA



Consultare istruzioni per l'uso



Rischio biologico



Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)



Limiti temperatura di conservazione



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Fabbricante

Kit for fibrinogen determination – Clauss method



**Reagent R1 is classified as Xn = noxious
CONTAINS NATRIUM AZOTURE**

R22: noxious for ingestion

R52/53: noxious for aquatic organism, may be produce long-term negative effects for per aquatic environment

S36/37: use protective clothes and suitable gloves

S60: this material and its container must be removed as dangerous waste

S61: do not waste in environment. Refer to special instructions/informative sheet for security

PRINCIPLE

FIBRINOGEN kit measure clotting time, exclusive expression of fibrinogen quantity in the sample, according to the original method by Clauss. In presence of high concentrations of Thrombin, the time required for clot formation in diluted plasma is inversely proportional to the fibrinogen concentration.

Note: the dilution of considered plasma serves to minimized the interferences of any anticoagulant as heparin.


REAGENTS

- R1** Imidazole buffer pH 7.4
- R2** Bovin thrombin ~ 100 NIH units/ml
- R3** Control plasma normal (N)
- R4** Control plasma pathological (P)
- R5** Fibrinogen Calibrator

SAMPLE

- Fresh blood in 3.2 % (0.109M) trisodium citrate.
- Collect the sample and, avoiding haemolysis and contaminations, mix immediately blood with anticoagulant (9 parts blood and 1 of 3.2 % trisodium citrate). Sample that do not reach the volume of 90% must be discarded.
- Centrifuge at 2500 x g for 15 minutes and separate the supernatant plasma.
- Run the test immediately (within 2 h) if stored at 22-24 °C.

Note

 Calibrator (R5) and human Controls (R3 and R4) are obtained using only blood of donors tested by an FDA method and found non-reactive for HbsAg and negative for antibodies to HIV-1/2 and HCV. However, no known test method can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit infectious diseases, this product should be handled as potentially infectious biological material.

- Every time infectious agents, chemical reagents, human or animal reagents, blood or other biological fluids are handled it's advisable follow common advices and all hygienic precautions as disposable gloves.

PREPARATION OF REAGENTS

- Reagent **R1** is liquid and ready to use.
- Reagent **R2:** reconstitute bovin thrombin vial with 2 ml of distilled water. Agitate gently until solution is complete.
With a photomeccanic device is suggested to reconstitute Bovin thrombin with 2 ml of Caolin instead of distilled water.
- Reagent **R3-R4-R5:** reconstitute with 1 ml of distilled water. Agitate gently until solution is complete and let it stand, before using, 15 minutes at room temperature.

Note

- It is essential that the reagent is at 15-25 °C when it is used.

STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2-8 °C.
- Reagents, if used and stored according to good laboratory practice, are stable up to the expiry date showed on the label.
- Reconstituted **R2** is stable 7 days at 2-8 °C and 30 days if frozen within 4 hours from the reconstitution; in this case, when it is used, thaw rapidly at 37 °C. Do not refreeze.
- Reconstituted **R3, R4 and R5** are stable 8 hours stored at 2-8 °C.

PRECAUTION IN USE

Look at the caution advices indicated nearby the symbol.

Caution: the reagents contain Sodium Azide (0.095%) as preservative. Avoid swallowing and contacting with skin, eyes and mucous membranes.

WASTE MANAGEMENT

Please refer to the local legal requirements.

PROCEDURE

- Prepare, with imidazole buffer, 4 different scaled dilutions (1:5, 1:10, 1:15, 1:35) of calibrator for fibrinogen and test it as described below.
- Note:** the diluted plasma 1:10 represent 100% of the assigned value. The dilution factor indicates the relationship between the 1:10 dilution and the other dilutions.
- Dilute the supernatant (tested sample) and the possible quality controls (ricostituted with imidazole buffer in 1:10).
- Distribute in plastic test tubes and run the tests of different dilutions of calibrator for fibrinogen (for reference curve), of controls and sample, both diluted, following this plan:

Diluted sample	200 µl
Incubate for 4-6 minutes at 37 °C then add	
Bovin thrombin	100 µl
At the Thromboplastin addition measure the time of clot formation. (seconds).	

PREPARATION OF CALIBRATION CURVE

- Build, on bilogarithmic scale, the calibration curve placing on the abscissa the concentrations (mg/dl) of scaled dilutions of calibrator for fibrinogen and on ordinate the corresponding times of clot formation.

Example: calibrator for fibrinogen = 304 mg/dl

DILUTION	DILUTION FACTOR	FIBRINOGEN CONCENTR. (mg/dl)	COAGULATION MEAN TIME (sec)
1:5	10/5 = 2	304 x 2 = 608	6.6
1:10	10/10 = 1	304 x 1 = 304	12.3
1:15	10/15 = 0.67	304 x 0.67 = 204	18.6
1:35	10/35 = 0.29	304 x 0.29 = 88	24.2

- Obtain the fibrinogen concentrations of sample and control placing on the calibration curve their times of clot formation.

REFERENCE VALUES

Generally the normal reference range is 150- 350 mg/dl. However, It's advisable that every laboratory determine its own reference values.

ANALYTICAL PERFORMANCES

Accuracy

A low, a normal, and a high fibrinogen plasma were tested in multiple laboratories using FIBRINOGEN and the results were compared to results obtained using other manufacturer's reagents.

The results are reassumed as follows:

N	SAMPLE	FIBRINOGEN	N	OTHER REAGENTS
10	Low	144 mg/dl	196	163 mg/dl
10	Normal	294 mg/dl	196	297 mg/dl
10	High	488 mg/dl	390	474 mg/dl

Precision

A low, a normal and a high fibrinogen plasma were tested on multiple days using FIBRINOGEN on a photo-optical instrument.

Ten standard curves were determined on each test day.

The percent CV of each plasma were:

5.9% for low plasma

3.4% for normal plasma

2.9% for high plasma

QUALITY CONTROLS

- It's advisable, with sample or at least with every tests group, for lot changing or for important instrument adjustment run a normal and pathological control.

- The normal and pathological control included in the kit correspond to a lyophilised normal plasma and a correct plasma to simulate a plasma with moderate deficit.

LIMITATIONS

- Blood must be immediately added to trisodium citrate anticoagulant and gently mixed (DO NOT USE EDTA AND HEPARIN).

- 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 nonwetable 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
- Freezing and thawing plasma that contains residual cells will generate damaged cells 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.

BIBLIOGRAPHY

Clauss A.: Acta Haemat 17, 237-246 (1957)

NCCLS: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays; 2nd edition Approved Guideline. NCCLS document H21-A3, Wayne PA. (1998)

NCCLS : Procedure for determining fibrinogen in plasma . Approved guideline. NCCLS Document H30-A2. Wayne , PA, (2001)

Musgrave K. A., Bick R.L.: Qualità assurance in the Haemostasis Laboratori. In bick R.L. et al. Editors: Hematology: Clinical and Laboratori Practice Vol. 2, 1309 - 1315, Mosby St. Louis MO (1993)

SYMBOLS



Read instruction for use



Biological risk



CE mark (requirement of 98/79 regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer