

FIBRINOGENO

Metodo basato sul tempo di Trombina

REF. 1004 5x2 ml (senza Calibratore e Controlli)
REF. 1005 10x2 ml (senza Calibratore e Controlli)



AZIENDA CERTIFICATA DNV
UNI EN ISO 9001:2008
UN EN ISO 13485:2012



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 200 (5/10 flaconi)	Trombina bovina tamponata liofilizzata
Tampone Imidazolo (1x100 ml)	Tampone Imidazolo in soluzione salina Sodio azide 0.2 g/l

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.

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

Ricostituire il contenuto di un flacone di **Trombina bovina** con 2.0 ml di acqua distillata. Agitare delicatamente fino a completo scioglimento.

Il materiale ricostituito si mantiene stabile per 7 giorni a 2-8°C, 8 ore a 15-30°C oppure può essere congelato entro 4 ore dall'uso per 30 giorni. Scongela rapidamente a 37°C. Non congelare nuovamente.

Con strumentazione foto-ottica o meccanica si consiglia di ricostituire la Trombina bovina, anziché con acqua distillata, con 2.0 ml di CAOLINO (disponibile separatamente – REF. 1010).

Ricostituire il **Calibratore Fibrinogeno**, il **Control Plasma N** e il **Control Plasma P** con 1.0 ml di acqua distillata. Agitare dolcemente e lasciar 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.

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

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Ciascuna unità del materiale originale utilizzata per la preparazione del Calibratore o dei Controlli è stata testata tramite un metodo approvato dalla FDA ed è risultata non reattiva per HbsAg e negativa agli anticorpi HIV e HCV. Ciononostante nessun test noto è in grado di garantire al 100 % che i prodotti ottenuti dal sangue umano non possano trasmettere epatite, AIDS o altre infezioni. Questi prodotti, al pari di tutti i materiali di origine umana, deve essere trattato alla stregua dei materiali biologicamente infettivi. Smaltire i rifiuti secondo le norme locali vigenti.

PROCEDURA DEL TEST

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

Pipettare nelle provette di plastica o vetro siliconato:

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.

La frequenza della preparazione della curva è in parte determinata dal metodo di rilevamento del coagulo utilizzato. 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

Preparare diverse diluizioni scalari del Calibratore Fibrinogeno in Tampone Imidazolo e testarle come descritto nel procedimento.

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 = **304 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)	Tempo medio di coagulazione (sec)
1:3.5	10/3.5 = 2.9	304x2.9 = 882	5.8
1:5	10/5 = 2	304x2 = 608	7.3
1:10	10/10 = 1	304x1 = 304	13.4
1:15	10/15 = 0.67	304x0.67 = 204	20.8
1:35	10/3.5 = 0.29	304x0.29 = 88	49.2

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 dolcemente. **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:

130 – 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: in giorni diversi è stato analizzato un plasma con valore del fibrinogeno basso, normale e alto utilizzando il reagente su strumentazione foto-ottica. In ogni giorno di prova sono state determinate dieci curve standard, per un totale di 30 curve standard. E' stato riscontrato un CV percentuale pari a 5.9 % (basso), 3.4 % (normale) e 2.9 % (alto).

Accuratezza: Un plasma con valore del fibrinogeno basso, normale ed alto è stato analizzato in diversi laboratori utilizzando il nostro reagente. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in vari laboratori utilizzando reagenti di altre ditte produttrici.

Campione	Reagente Giesse	n =	Tutti i reagenti	n =
Basso	144 mg/dl	10	163 mg/dl	195
Normale	294 mg/dl	10	297 mg/dl	195
Alto	488 mg/dl	16	474 mg/dl	300

BIBLIOGRAFIA

1. Clauss, A. Acta Haemat. 17, 237-246, 1957.
2. NCCLS: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays. 2nd edition. Approved Guideline. NCCLS Document H21-A3, Wayne PA, 1998.
3. NCCLS: Procedure for determining fibrinogen in plasma. Approved guideline. NCCLS Document H30-A2. Wayne PA, 2001.
4. Musgrave, K.A., Bick, R.L.: Quality Assurance in the Hemostasis Laboratory. In Bick, R.L., et al, editors: Hematology: Clinical and Laboratory Practice. Vol. 2, pp 1309-1315. Mosby. St. Louis. MO., 1993.



FIBRINOGEN

Method based on Thrombin clotting time

DNV CERTIFIED COMPANY

UNI EN ISO 9001:2008

UN EN ISO 13485:2012



REF. 1004 5x2 ml (without Calibrator and Controls)
REF. 1005 10x2 ml (without Calibrator and Controls)

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 200 (5/10 vials)	Lyophilized buffered Bovine Thrombin
Imidazole Buffer (1x100 ml)	Imidazole buffer in saline Sodium azide 0.2 g/l

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

Reconstitute the contents of one vial of **Bovine Thrombin** with 2.0 ml of distilled water. Agitate gently until solution is complete.

The reconstituted material is stable 7 days at 2-8°C, 8 hours at 15-30°C or may be frozen within 4 hours for use within 30 days. Thaw rapidly at 37°C. Do not refreeze.

Using photo-optical or mechanical instruments it is advisable to reconstitute the Bovine Thrombin, with distilled water instead, with 2.0 ml of Kaolin (available separately – REF. 1010).

Reconstitute the **Fibrinogen Calibrator**, the **Control Plasma N** and the **Control Plasma P** with 1.0 ml of distilled water. Swirl gently and let stand undisturbed for 15 minutes at room temperature. Do not invert vial or mix vigorously. After proper reconstitution, calibrator and controls are stable for 2 respectively and for 8 hours at 2-8°C.

All reagents must be at room temperature before use.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Each unit of source material used in the preparation of this product has been tested by an FDA licensed method and found non-reactive for HbsAg and negative for antibodies to HIV and HCV. However, no known test method can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit hepatitis, AIDS or other infectious diseases. This product, like all materials of human origin, should be handled as potentially infectious biological material.

Dispose of waste according to local laws.

TEST PROCEDURE

Dilute samples and controls 1:10 with Imidazole buffer (50 µl + 450 µl).

Pipette into plastic or siliconized glass tubes:

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

Prepare several dilutions of Fibrinogen Calibrator in Imidazole Buffer and test as described in the procedure.

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 = **304 mg/dl** (each laboratory must prepare curves with their reagents and instrumentation).

Dilution	Dilution factor	Fibrinogen (mg/dl)	Mean CT (sec)
1:3.5	10/3.5 = 2.9	304x2.9 = 882	5.8
1:5	10/5 = 2	304x2 = 608	7.3
1:10	10/10 = 1	304x1 = 304	13.4
1:15	10/15 = 0.67	304x0.67 = 204	20.8
1:35	10/35 = 0.29	304x0.29 = 88	49.2

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 ed 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.

Giesse Diagnostics srl

V. Enrico Fermi, 3 - Z.I. V. Tiburtina Km 18.300 - 00012 Guidonia Montecelio (RM) - Italia

Tel. +39 0774 051100 - Fax +39 0774 051111

e-mail: info@giessediagnostics.com – web site: www.giessediagnostics.com

100407

Ed. 2014/12 rev. 01

9. 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.
10. High paraprotein levels, thrombin antibodies, and drugs that activate the fibrinolytic system can interfere with fibrinogen assays.
11. 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:

130 – 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: a low, a normal, and a high fibrinogen plasma were tested on multiple days using reagents on a photo-optical instrument. Ten standard curves were determined on each test day, for a total of 30 standard curves. The percent CV was determined to be 5.9 % (low), 3.4 % (normal) and 2.9 % (high).

Accuratezza: A low, a normal, and a high fibrinogen plasma were tested on multiple days using our reagents. These results were compared to results obtained using other manufacturer's reagents in multiple laboratories.

Sample	Giesse Reagent	n =	All reagents	n =
Low	144 mg/dl	10	163 mg/dl	195
Normal	294 mg/dl	10	297 mg/dl	195
High	488 mg/dl	16	474 mg/dl	300

REFERENCES

5. Clauss, A. Acta Haemat. 17, 237-246, 1957.
6. NCCLS: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays. 2nd edition. Approved Guideline. NCCLS Document H21-A3, Wayne PA, 1998.
7. NCCLS: Procedure for determining fibrinogen in plasma. Approved guideline. NCCLS Document H30-A2. Wayne PA, 2001.
8. Musgrave, K.A., Bick, R.L.: Quality Assurance in the Hemostasis Laboratory. In Bick, R.L., et al, editors: Hematology: Clinical and Laboratory Practice. Vol. 2, pp 1309-1315. Mosby. St. Louis. MO., 1993.

