

FIBROTEK FIB

Fibrinogen Assay Kit. 100 Determinations



C. Testing of Patient Specimen

- Dilute the test plasma 1:10 in Imidazole buffer
- Pipette 200µL of test plasma into test tube and incubate for 2 minutes at 37° C.
- Add 100µL of Thrombin Reagent and immediately start the timing device.
- Record the clotting time and average the duplicates to obtain the mean value.
- Obtain the mean clotting times for each sample of the test plasma.

Quality Control

Quality control of assays involves multiple components. Each laboratory should establish a quality control program that includes normal and abnormal controls plasmas. **PlasmaCon N**, **PlasmaCon L-1** and **PlasmaCon L-2** have been assayed for fibrinogen and are recommended for use. If the controls do not perform within the reference range, patient results should be considered invalid and not reported.

RESULTS

Standard Curve

- Use log-log graph paper or spreadsheet software to construct the reference standard curve.
- Plot the mean clotting time for each dilution of the Fibrinogen Calibrator on the Y-axis and the concentration of each dilution on the X-axis. Construct a best-fit straight line using all 5 points.

Test Plasma

- Plot the mean clotting time of the 1:10 dilution on the reference curve.
- Interpolate the result by drawing a straight line from the clotting time point down through the X axis to give the fibrinogen concentration in mg/dL.
- For plasmas with dilutions of other than 1:10 i.e. 1:20, the concentration read from the curve must be multiplied by the dilution factor. If a dilution of 1:20 was used, then the result must be multiplied by 2 to compensate for the dilution.

LIMITATIONS

Significant levels of heparin and elevated levels of fibrin(ogen) degradation products (FDP) in the patient plasma can cause falsely low fibrinogen results. However because of the high thrombin concentration used in this kit, therapeutic plasma heparin levels do not interfere.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Precision

Precision studies were performed to establish Within Run and Between Run CV’s for normal controls and abnormal controls. Assays were performed using photo-optical and mechanical coagulation analyzers.

<i>Normal</i>	<i>Within Run</i>	<i>Between Run</i>
n	40	20
Mean	272.7 mg/dL	275.8 mg/dL
SD	14.1 mg/dL	9.69 mg/dL
CV	3.55%	3.43%

<i>Abnormal</i>	40	20
Mean	168.0 mg/dL	162.7 mg/dL
SD	5.4 mg/dL	8.02 mg/dL
CV	3.2%	4.81%

2. Comparison

A comparison study was done using the FibroTek assay and a comparative method on 110 normal and abnormal samples using two different coagulation analyzer types. The linear regression equations and the coefficient of determination (r²) were as follows.

Photo-optical
n =110 **Y = 0.8592x + 8.565** **r² = 0.9693**

Mechanical
n=110 **Y = 0.8479x + 21.941** **r² = 0.9582**

Y = FibroTek FIB kit

X = Reference Kit

Version Francaise

APPLICATION

Le kit de dosage du fibrinogène **FIBROTEK FIB** est conçu pour être utilisé dans la détermination quantitative du fibrinogène dans du plasma humain citraté.

RÉSUMÉ

Le fibrinogène est une glycoprotéine de poids moléculaire élevé synthétisée dans le foie, qui joue un rôle fondamental dans l'hémostase. L'interaction entre la thrombine et le fibrinogène entraîne la production de fibrine, un réseau de polymères insolubles entrecroisés. Pour que l'hémostase ait lieu normalement en cas de blessure ou de lésion tissulaire, il faut une concentration suffisante en fibrinogène dans le plasma. La quantification du fibrinogène présent dans le plasma peut être importante pour le diagnostic de certaines pathologies telles la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou les maladies hépatiques. Pour que le diagnostic ait lieu normalement en cas de blessure ou de lésion tissulaire, il faut une concentration suffisante en fibrinogène dans le plasma. La quantification du fibrinogène présent dans le plasma peut être importante pour le diagnostic de certaines pathologies telles la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) ou les maladies hépatiques. Les déficiences congénitales en fibrinogène sont rares, parmi lesquelles l'afibrinogénémie et l'hypofibrinogénémie. Ce dosage est également important pour identifier les dysfibrinogémies, où le fibrinogène est présent mais comporte des anomalies moléculaires. Le taux de fibrinogène augmente dans les réactions de phase aiguë, lors de la grossesse et de la prise de contraceptifs oraux.

PRINCIPE

La mesure quantitative du fibrinogène fait le plus souvent appel à la technique de Clauss, qui mesure le temps de coagulation du plasma dilué après ajout de thrombine. Lorsque la concentration en thrombine est élevée (> 30 unités NIH/ml) et la concentration en fibrinogène faible, le taux de fibrinogène est inversement proportionnel au temps de coagulation de la thrombine apparaissant sur le graphique logarithmique.

RÉACTIFS

Avertissement : POUR UTILISATION DIAGNOSTIQUE IN VITRO UNIQUEMENT

1. Réactif thrombine

Ingrédients: Le réactif contient une préparation lyophilisée de thrombine humaine d'environ 100 unités NIH/ml, ainsi que des stabilisateurs ajoutés.

Préparation avant utilisation : Reconstituer chaque flacon de réactif thrombine avec 2,0 ml d'eau distillée comme indiqué sur l'étiquette du flacon. Retourner doucement le flacon pour mélanger, sans secouer, et laisser reposer pendant 10 minutes à température ambiante avant utilisation.

Conservation et stabilité : Le produit lyophilisé doit être conservé entre 2 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le flacon. Après reconstitution, la solution de thrombine est stable pendant 8 heures si elle est conservée à température ambiante (20-24 °C) ou pendant une semaine si elle est conservée entre 2 et 8°C. Ne pas utiliser si un précipité s'est formé au cours de la conservation.

2. Calibrateur fibrinogène

Ingrédients: Le calibrateur est du plasma humain normal lyophilisé dont le fibrinogène a été dosé par un test fonctionnel de coagulation. Se reporter à l'étiquette du flacon pour connaître la valeur attribuée pour le lot (en mg/dl).

Préparation avant utilisation : Reconstituer chaque flacon avec 1 ml d'eau distillée. Remuer doucement pour mélanger ; ne pas secouer. Laisser reposer pendant 15 minutes à température ambiante (20-24 °C) avant utilisation.

AVERTISSEMENT : RISQUE BIOLOGIQUE : Le plasma utilisé pour préparer le calibrateur fibrinogène s'est avéré négatif à l'antigène de l'hépatite B (HBsAg) et aux anticorps anti-VHC et anti-VIH lors de l'utilisation de tests agréés par la FDA.

Cependant, le calibrateur doit être manipulé avec les mêmes précautions que celles observées lors de la manipulation de plasmas de patients potentiellement infectieux.

English Version

INTENDED USE

The **FIBROTEK FIB** Fibrinogen Assay Kit is intended for use in the quantitative determination of fibrinogen in citrated human plasma.

SUMMARY

Fibrinogen, a high molecular weight glycoprotein synthesized in the liver, plays a fundamental role in hemostasis. The interaction between thrombin and fibrinogen leads to production of the insoluble cross-linked polymer fibrin. For normal hemostasis to occur in response to injury or tissue damage, a sufficient concentration of fibrinogen must be present in plasma. Quantitation of plasma fibrinogen can be important in disease states such as disseminated intravascular coagulation (DIC), liver disease, and thrombolytic therapy. Rare congenital deficiencies of fibrinogen can occur including afibrinogenemia and hypofibrinogenemia. Dysfibrinogenemias in which abnormal molecular forms of fibrinogen are present can also occur. Elevated levels of fibrinogen can be found in acute phase reactant responses, pregnancy, and oral contraceptive use.

PRINCIPLE

Quantitative measurement of fibrinogen is most commonly done using the Clauss technique, which involves measuring the clotting time of dilute plasma after the addition of thrombin. At high thrombin concentrations (>30 NIH units/mL) and low fibrinogen concentrations, the fibrinogen level is inversely proportional to the thrombin clotting time plotted on log - log graph paper

REAGENTS

Warning: FOR IN-VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

1. Thrombin Reagent

Ingrédients: The reagent contains a lyophilized preparation of human thrombin of approximately 100 NIH units/mL plus added stabilizers.

Préparation for use: Reconstitute each vial of thrombin reagent with 2.0 mL of distilled water as indicated on the vial label. Invert gently to mix, do not shake, and allow to stand for 10 min. at room temperature before use.

Storage and stability: The lyophilized product should be stored at 2–8°C until the expiration date on the vial. After reconstitution, the thrombin solution is stable for 8 hours at room temperature (20–24°C) or 1 week at 2–8°C. Do not use if precipitation occurs during storage.

2. Fibrinogen Calibrator

Ingrédients: The calibrator is lyophilized normal human plasma assayed for fibrinogen by a functional clotting assay. See vial label for assigned assay value for the current lot given in mg/dL.

Préparation for use: Reconstitute each vial with 1 mL of distilled water. Swirl gently to mix; do not shake. Allow to stand for 15 minutes at room temperature (20–24°C) before use.

WARNING: POTENTIAL BIOHAZARD. The plasma used to prepare the fibrinogen calibrator has been tested and found negative for Hepatitis B antigen (HBsAg) and antibodies to HIV and HCV by FDA licensed tests.

However the calibrator should be handled with the same precautions as those observed when handling potentially infectious patient plasmas.

Storage and stability: The reagent is stable until the date indicated on the label when stored at 2–8°C. After reconstitution, the calibrator is stable for 8 hours at 2–8°C.

3. Imidazole Buffer

Ingrédients: Buffer contains 15 mM Imidazole, 0,125 M Sodium Chloride with 0.02% sodium azide as preservative. **WARNING: Sodium Azide.** The Imidazole buffer is preserved with sodium azide, which can form highly explosive metal azides if exposed to lead or copper in plumbing. Any

such materials should be discarded into a sink only with large volumes of water to minimize such a risk.

Préparation for use: The buffer is packaged ready for use.

Storage and stability: The buffer is stable until the date indicated on the label when stored at 2–8°C.

TECHNIQUES

The fibrinogen assay may be performed by accepted manual methods, or by using optical or electromechanical coagulation analyzers.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Specimen: Plasma obtained from whole blood anticoagulated with 0.1M sodium citrate.

Specimen Collection: Nine parts freshly collected whole blood should be immediately added to one part citrate anticoagulant and mixed thoroughly.

Specimen Preparation: Centrifuge the whole blood at 2500 x g for 15 minutes (NCCLS H21-A2, 1991). Immediately separate the plasma from the red cells using a plastic pipette (if necessary), and place in a plastic test tube.

Storage and stability: Before and during testing, the samples must be tested within 2 hours if stored at 22-24°C. Frozen samples should be thawed rapidly at 37°C before testing (NCCLS H21-A2).

TEST PROCEDURE

Materials provided:

100 determinations

5 vials Thrombin reagent-2 mL
3 vials Fibrinogen Calibrator -1 mL
1 bottle Imidazole buffer -135 mL
Instructions for Use

Materials required but not provided:

Pipettes for 50, 100 and 200µL volumes
12 x 75 mm plastic test tubes
Stopwatch or timing device
Coagulation analyzer
37°C waterbath or heating block
Instrument cuvettes
log paper

Additional equipment and supplies available from r² Diagnostics:

PlasmaCon N (Normal Control Plasma)

PlasmaCon L-1 (Abnormal Control Plasma)

PlasmaConL-2 (Abnormal Control Plasma)

STEP-BY-STEP METHOD

The following is the manual method. Please refer to the User Manual for instructions, if an automated instrument is to be used.

A. Specimen and Reagent Preparation

- All test tubes, syringes and pipettes should be plastic
- Collect and prepare the blood sample specimen according to the directions outlined in the **SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION** section.
- Prepare the reagents according to the reconstitution instructions in the **REAGENTS** section.

B. Preparation of Fibrinogen Reference Curve

- Allow all reagents to equilibrate to room temperature.
- Using Imidazole Buffer, prepare dilutions of Fibrinogen Calibrator: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 and 1:40 in 12 x 75mm test tubes as follows

	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40
Buffer	0.8mL	0.9mL	1.9mL	2.9mL	3.9mL
Calibrator	0.2mL	0.1mL	0.1mL	0.1mL	0.1mL

- Perform duplicate determinations on each dilution of the Fibrinogen Calibrator as follows:
 - Pipette 200µL of diluted calibrator into a test tube and incubate for 2 minutes at 37° C.
 - Add 100µL of Thrombin Reagent and immediately start the timing device.
 - Obtain the clotting times for each of the dilutions of the Fibrinogen Calibrator.

- Amener tous les réactifs à température ambiante.
- À l'aide du tampon d'imidazole, préparer les dilutions du calibrateur fibrinogène : 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 et 1:40 dans des tubes à essai 12 x 75 mm, comme suit :

	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40
Tampon	0,8 ml	0,9 ml	1,9 ml	2,9 ml	3,9 ml
Calibrateur	0,2 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

- Effectuer deux déterminations sur chaque dilution du calibrateur fibrinogène, comme suit :
 - Pipeter 200 µL de calibrateur dilué dans un tube à essai et incuber pendant 2 minutes à 37 °C.
 - Ajouter 100 µL de réactif thrombine et lancer immédiatement le chronomètre.
 - Noter les temps de coagulation pour chaque dilution du calibrateur fibrinogène.

C. Analyse des échantillons de patient

- Diluer le plasma devant être analysé à 1:10 dans le tampon d'imidazole
- Pipeter 200 µL de plasma dans un tube à essai et mettre à incuber pendant 2 minutes à 37 °C.
- Ajouter 100 µL de réactif thrombine et lancer immédiatement le chronomètre.
- Noter le temps de coagulation et calculer la moyenne des deux analyses pour obtenir la valeur moyenne.
- Obtenir le temps de coagulation moyen pour chaque échantillon de plasma analysé.

Contrôle qualité

Le contrôle qualité des dosages intègre de nombreux éléments. Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle qualité incluant des plasmas de contrôle normaux et anormaux. **PlasmaCon N**, **PlasmaCon L-1** et **PlasmaCon L-2** ont été testés pour le fibrinogène et sont recommandés pour ce faire. Si les performances des contrôles ne se situent pas dans les plages de référence, les résultats des patients doivent être considérés comme non valides et ne doivent pas être enregistrés.

RÉSULTATS

Courbe étalon

- Utiliser du papier logarithmique ou un tableur pour pour construire la courbe étalon de référence.
- Tracer le temps de coagulation moyen pour chaque dilution du calibrateur fibrinogène sur l'axe des ordonnées et la concentration de chaque dilution sur l'axe des abscisses. Tirer la droite de meilleur ajustement en utilisant les 5 points.

Plasma analysé

- Tracer le temps de coagulation moyen pour la dilution 1:10 sur la courbe de référence.
- Interpoler le résultat en tirant une droite du point correspondant au temps de coagulation sur l'axe des abscisses, ce qui donne la concentration du fibrinogène en mg/dl.
- Pour les plasmas ayant subi une dilution supérieure à 1:10 (ex. : 1:20), la concentration lue sur la courbe doit être multipliée par le facteur de dilution. Si la dilution était de 1:20, le résultat doit donc être multiplié par 2 pour compenser la dilution.

LIMITES

Des taux significatifs d'héparine et des taux élevés de produits de dégradation de la fibrine ou du fibrinogène dans le plasma du patient peuvent générer des résultats faussement faibles. Cependant, en raison de la haute teneur en thrombine de ce kit, il n'y a pas d'interférence avec l'héparine plasmatique si elle demeure à des niveaux thérapeutiques.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Précision

Des études de précision ont été réalisées pour déterminer les valeurs de contrôle intracycle et inter-cycles pour les contrôles normaux et anormaux. Ces tests ont été effectués à l'aide d'analyseurs de coagulation photo-optiques et mécaniques.

<i>Normal</i>	<i>Intracycle</i>	<i>Inter-cycles</i>
n	40	20
Moyenne	272,7 mg/dl	275,8 mg/dl
ET	14,1 mg/dl	9,69 mg/dl
VC	3,55%	3,43%

<i>Anormal</i>		
n	40	20
Moyenne	168,0 mg/dl	162,7 mg/dl
ET	5,4 mg/dl	8,02 mg/dl
VC	3,2 %	4,81 %

2. Comparaison

Une étude de comparaison a été réalisée avec le test FibroTek et en s'appuyant sur une méthode comparative portant sur 110 échantillons normaux et anormaux, sur deux types d'analyseur de coagulation différents. Les équations de régression linéaire et le coefficient de détermination (r²) étaient les suivants :

Méthode photo-optique
n=**110**
Y = **0,8592x + 8,565**
r² = 0,9693

Méthode mécanique
n=**110**
Y = **0,8479x + 21,941**
r² = 0,9582
Y = Kit FibroTek FIB
X = Kit de référence

Deutsche Version

VERWENDUNGSZWECK

Das **FIBROTEK FIB** Fibrinogen Assay-Kit ist für die quantitative Bestimmung von Fibrinogen in zitriertem Humanplasma bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG

Fibrinogen ist ein hochmolekulares Glykoprotein, das in der Leber gebildet wird und eine entscheidende Rolle bei der Hämostase spielt. Durch die Wechselwirkung zwischen Thrombin und Fibrinogen kommt es zur Bildung unlöslicher vernetzter Fibrinpolymere. Damit es nach einer Verletzung oder einem Gewebsschaden zur normalen Hämostase kommt, ist eine ausreichende Konzentration an Fibrinogen im Plasma erforderlich. Daher ist die quantitative Bestimmung des Plasma-Fibrinogen u.U. von entscheidender Bedeutung bei Krankheitszuständen wie disseminierter intravaskulärer Gerinnung (DIC), Leberkrankheit und Thrombolysetherapie. In seltenen Fällen kann ein angeborener Fibrinogenmangel auftreten, einschließlich Afibrinogenämie und Hypofibrinogenämie. Es kann auch zu Dysfibrinogenämien kommen, bei denen abweichende molekulare Formen von Fibrinogen vorkommen. Zu erhöhten Fibrinogen-Spiegeln kommt es außerdem bei der Akute-Phase-Reaktion, Schwangerschaft und Verwendung oraler Verhütungsmittel.

PRINZIP

Die quantitative Fibrinogenbestimmung wird am häufigsten mittels der Clauss-Methode vorgenommen, bei der die Gerinnungszeit des verdünnten Plasmas nach Zugabe von Thrombin gemessen wird. Bei hohen Thrombinkonzentrationen (>30 NIH-E/mL) und niedrigen Fibrinogenkonzentrationem ist das Fibrinogen-Niveau umgekehrt proportional zur Thrombin-Gerinnungszeit auf der doppelt logarithmischen Kurve.

REAGENZIEN

Warnung: NUR FÜR DIE *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

1. Thrombin-Reagenz

Zusammensetzung: Das Reagenz enthält lyophilisiertes Humanthrombin von etwa 100 NIH-E/mL und Stabilisatoren.
Vorbereitung zum Gebrauch: Jedes Fläschchen Thrombinreagenz entsprechend den Angaben auf dem Etikett mit 2,0 mL destilliertem Wasser rekonstituieren. Zum Mischen vorsichtig mehrmals umdrehen, nicht schütteln und vor Gebrauch 10 Minuten bei Zimmertemperatur ruhen lassen.
Lagerung und Stabilität: Das lyophilisierte Produkt sollte bis zum Verfallsdatum auf dem Fläschchen bei 2 - 8 °C gelagert werden. Nach der Rekonstituierung ist die Thrombinlösung bei Zimmertemperatur (20 - 24 °C) für 8 Stunden oder bei 2 - 8 °C für 1 Woche stabil. Wenn während der Lagerung ein Niederschlag ausgefällt wird, Lösung nicht verwenden.

2. Fibrinogen-Kalibrator

Zusammensetzung: Bei dem Kalibrator handelt es sich um lyophilisiertes Normal-Humanplasma, das in einem funktionellen Gerinnungssassy für Fibrinogen getestet wurde. Auf dem Etikett auf dem Fläschchen finden Sie den zugewiesenen Assaywert für das vorliegende Los in mg/dL.

Vorbereitung zum Gebrauch: Jedes Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser rekonstituieren. Zum Vermischen vorsichtig schwenken, nicht schütteln! Vor Gebrauch 15 Minuten bei Zimmertemperatur (20 - 24 °C) ruhen lassen.

WARNUNG: POTENZIELLE BIOGEFAHR Das für die Herstellung des Fibrinogen-Kalibrators verwendete Plasma wurde untersucht und erwies sich in von der FDA zugelassenen Tests als Hepatitis B-Antigen (HBsAg)-negativ und HIV- und HCV-Antikörper-negativ.

Beim Umgang mit dem Kalibrator sind jedoch die Vorsichtsmaßnahmen zu beachten, die auch üblicherweise beim Umgang mit potenziell infektiösem Patientenplasma gelten.

Lagerung und Stabilität: Bei Lagerung bei 2 - 8 °C ist das Reagenz bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum

stabil. Nach der Rekonstituierung ist der Kalibrator für 8 Stunden bei 2 - 8 °C stabil.

3. Imidazolpuffer

Zusammensetzung: Der Puffer enthält 15 mM Imidazol, 0,125 M Natriumchlorid mit 0,02 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

WARNUNG: Natriumazid. Der Imidazolpuffer enthält als Konservierungsmittel Natriumazid, das hoch explosive Metallazide bilden kann, wenn es in den Rohrleitungen mit Blei oder Kupfer in Berührung kommt. Daher sollte beim Entsorgen dieser Materialien im Becken mit viel Wasser nachgespült werden, um dieses Risiko zu senken.

Vorbereitung zum Gebrauch: Der Puffer ist gebrauchsfertig verpackt.

Lagerung und Stabilität: Bei Lagerung bei 2 - 8 °C ist der Puffer bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

VERFAHREN

Zur Durchführung des Fibrinogen-Assays können anerkannte manuelle Verfahren bzw. optische oder elektromechanische Gerinnungsanalysatoren verwendet werden.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Probe: Aus Vollblut gewonnenes Plasma, das mit 0,1 M Natriumcitrat antikoaguliert wurde.

Probenentnahme: Neun Teile frisch entnommenes Vollblut sollten sofort mit einem Teil zitriertem Antikoagulans versetzt und gründlich gemischt werden.

Probenvorbereitung: Vollblut bei 2500 x g für 15 Minuten (CLSI/NCCLS H21-A2, 1991) zentrifugieren. Mithilfe einer Plastikpipette (falls erforderlich) Plasma sofort von den roten Blutzellen trennen und in ein Plastikteströhrchen füllen.
Lagerung und Stabilität: Bei Lagerung bei 22 - 24 °C müssen die Proben innerhalb von 2 Stunden getestet werden. Tiefgefrorene Proben sind vor dem Testen schnell bei einer Temperatur von 37 °C aufzutauen (CLSI/NCCLS H21-A2).

TESTVERFAHREN

Im Packungsumfang enthaltene Materialien: für 100 Bestimmungen
5 Fläschchen Thrombin-Reagenz 2 mL
3 Fläschchen Fibrinogen-Kalibrator 1 mL
1 Flasche Imidazolpuffer 135 mL
Gebrauchsanleitung

Benötigte Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind:

Pipetten mit einem Volumen von 50, 100 und 200µL
Plastikteströhrchen 12 x 75 mm
Stoppuhr oder anderes Zeitmessgerät
Gerinnungsanalysator
Wasserbad oder Heizplatte 37 °C
Küvetten
Millimeterpapier

Weitere von r² Diagnostics angebotene Ausrüstungen und Materialien:

PlasmaCon N (normales Kontrollplasma)
PlasmaCon L-1 (pathologisches Kontrollplasma)
PlasmaConL-2 (pathologisches Kontrollplasma)

STUFENWEISE METHODE

Nachfolgend ist die manuelle Methode dargestellt. Wenn ein automatisches Gerät verwendet werden soll, richten Sie sich nach den Anweisungen im Benutzerhandbuch.

A. Proben- und Reagenzvorbereitung

- Sämtliche Teströhrchen, Spritzen und Pipetten sollten aus Plastik bestehen.
 - Blutproben in Übereinstimmung mit den Richtlinien im Abschnitt **PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG** entnehmen und vorbereiten.
 - Reagenzien in Übereinstimmung mit den Anweisungen zur Rekonstituierung im Abschnitt **REAGENZIEN** vorbereiten.
- B. Vorbereitung der Fibrinogen-Referenzkurve**
- Alle Reagenzien auf Zimmertemperatur anwärmen lassen.

- Mithilfe des Imidazolpuffers Fibrinogen-Kalibratorverdünnungen im Verhältnis: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 und 1:40 in Teströhrchen von 12 x 75 mm vorbereiten. Dabei gelten folgende Verhältnisse:

	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40
Puffer	0,8 mL	0,9 mL	1,9 mL	2,9 mL	3,9 mL
Kalibrator	0,2 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL

- Bestimmung für jedes Verdünnungsverhältnis des Fibrinogen-Kalibrators in zweifacher Ausführung wie folgt vornehmen:
 - 200µL verdünnten Kalibrator in ein Teströhrchen pipettieren und für 2 Minuten bei 37 °C inkubieren.
 - 100µL Thrombin-Reagenz hinzufügen und sofort die Stoppuhr drücken.
 - Für jedes einzelne Verdünnungsverhältnis des Fibrinogen-Kalibrators die Gerinnungszeiten festhalten.

C. Testen von Patientenproben

- Testplasma im Verhältnis 1:10 in Imidazolpuffer verdünnen
- 200µL Testplasma in das Teströhrchen pipettieren und für 2 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- 100µL Thrombin-Reagenz hinzufügen und sofort die Stoppuhr drücken.
- Gerinnungszeit aufzeichnen und von den zweifachen Ergebnissen den Durchschnitt bilden, um den Mittelwert zu ermitteln.
- Mittlere Gerinnungszeit für jede einzelne Probe des Testplasmas ermitteln.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle für die Assays umfasst mehrere Komponenten. Jedes Labor sollte ein Verfahren zur Qualitätskontrolle entwickeln, das normale und pathologische Kontrollplasmen einschließt. **PlasmaCon N**, **PlasmaCon L-1** und **PlasmaCon L-2** wurden für Fibrinogen analysiert und deren Verwendung wird empfohlen. Wenn die Kontrollen nicht innerhalb des Referenzbereiches liegen, sind die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig anzusehen und dürfen nicht berichtet werden.

ERGEBNISSE

Standardkurve

- Zur Erstellung der Bezugsstandardkurve die doppelt logarithmische Kurve oder ein Tabellenkalkulationsprogramm verwenden.
- Mittlere Gerinnungszeit für jede einzelne Probe des Fibrinogen-Kalibrators auf der Y-Achse und die Konzentration jeder Verdünnung auf der X-Achse darstellen. Unter Verwendung aller 5 Punkte eine möglichst nahe liegende gerade Linie ziehen.

Testplasma

- Mittlere Gerinnungszeit für die 1:10-Verdünnung auf der Bezugskurve darstellen.
- Durch Ziehen einer geraden Linie vom erinnungszeitpunkt nach unten zur X-Achse zur Angabe der Fibrinogen-Konzentration in mg/dL das Ergebnis einfügen.
- Wenn Plasma mit einem anderen Verdünnungsverhältnis als 1:10 verwendet wird, z.B. 1:20, muss die von der Kurve abgelesene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Wenn ein Verdünnungsverhältnis von 1:20 verwendet wurde, muss das Ergebnis mit 2 multipliziert werden, um den Verdünnungsfaktor auszugleichen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Signifikante Heparinspiegel und erhöhte Werte bei Fibrin(ogen)-Spaltprodukten (FDP) im Patientenplasma können zu fehlerhaft niedrigen Fibrinogen-Ergebnissen führen. Aufgrund der bei diesem Kit verwendeten hohen Thrombinkonzentration interferieren die therapeutischen Heparinwerte im Plasma jedoch nicht.

LEISTUNGSMERKMALE

1. Präzision

Es wurden Präzisionsstudien zur Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Varianzoeffizienten für normale und pathologische Kontrollen durchgeführt. Bei der Durchführung der Assays wurden photooptische und mechanische Gerinnungsanalysatoren verwendet.

<i>Normal</i>	<i>Intra-Assay</i>	<i>Inter-Assay</i>
N	40	20
Mittelwert	272,7 mg/dL	275,8 mg/dL
SD	14,1 mg/dL	9,69 mg/dL
VK	3,55%	3,43%

<i>Pathologisch</i>		
N	40	20
Mittelwert	168,0 mg/dL	162,7 mg/dL
SD	5,4 mg/dL	8,02 mg/dL
VK	3,2 %	4,81 %

2. Vergleich

Unter Verwendung des FibroTek-Assays und einer vergleichbaren Methode wurde mit 110 normalen und pathologische Proben mit 2 verschiedenen Arten von Gerinnungsanalysatoren eine Vergleichsstudie durchgeführt. Die linearen Regressionsgleichungen und das Bestimmtheitsmaß (r²) lauteten wie folgt:

Photooptisch
N=**110**
Y = **0,8592x + 8,565**
r² = 0,9693

Mechanisch
N=**110**
Y = **0,8479x + 21,941**
r² = 0,9582

Y = FibroTek FIB-Kit

X = Referenz-Kit

B. Preparación de la curva de referencia de fibrinógeno

1. Deje que todos los reactivos se equilibren a temperatura ambiente.
2. Utilizando el tampón de imidazol, prepare las diluciones de calibrador de fibrinógeno: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40 en tubos de ensayo 12 x 75mm de la siguiente manera:

	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40
Tampón	0,8 mL	0,9 mL	1,9 mL	2,9 mL	3,9 mL
Calibrador	0,2 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL

3. Realice determinaciones por duplicado en cada dilución del calibrador de fibrinógeno de la siguiente manera:
(a) Pipetee 200 µL de calibrador diluido en un tubo de ensayo e incube durante 2 minutos a 37 °C.
(b) Añada 100 µL de reactivo de trombina e inicie inmediatamente el temporizador.
(c) Obtenga los tiempos de coagulación de cada una de la diluciones del calibrador de fibrinógeno.

C. Pruebas de muestras de pacientes

1. Diluya el plasma de la prueba con una relación de 1:10 en el tampón de imidazol
2. Pipetee 200 µL del plasma de la prueba en un tubo de ensayo e incube durante 2 minutos a 37 °C.
3. Añada 100 µL de reactivo de trombina e inicie inmediatamente el temporizador.
4. Registre el tiempo de coagulación y calcule el promedio de los duplicados para obtener el valor de media.
5. Obtenga los tiempos de coagulación medios de cada muestra del plasma de la prueba.

Control de calidad

El control de calidad de los ensayos implica varios aspectos. Cada laboratorio debe fijar un programa de control de calidad que incluya plasma de control normal y anormal. **PlasmaCon N**, **PlasmaCon L-1** y **PlasmaCon L-2** se han ensayado para el fibrinógeno y su uso está recomendado. Si el resultado de los controles no está dentro de su intervalo de referencia, los resultados del paciente deben considerarse no válidos y no deben registrarse.

RESULTADOS

Curva estándar

1. Utilice papel doblemente logarítmico o software de hoja de cálculo para crear la curva estándar de referencia.
2. Trace el tiempo de coagulación medio de cada dilución del calibrador de fibrinógeno en el eje Y y la concentración de cada dilución en el eje X. Cree una línea recta de ajuste óptimo con los 5 puntos.

Plasma de la prueba

1. Trace el tiempo de coagulación medio de la dilución con una relación de 1:10 en la curva de referencia.
2. Interpole el resultado dibujando una línea recta descendente desde el punto del tiempo de coagulación a través del eje X para obtener la concentración de fibrinógeno en mg/dL.
3. Para plasma con diluciones distintas de 1:10, como por ejemplo 1:20, la lectura de la concentración desde la curva se debe multiplicar por el factor de dilución. Si se ha utilizado una dilución de 1:20, el resultado se debe multiplicar por 2 para compensar la dilución.

LÍMITES

Los niveles significativos de heparina y los elevados niveles de productos de degradación de la fibrina (fibrinógeno) (FDP) en el plasma de paciente pueden originar falsos resultados de fibrinógeno bajo. Sin embargo, debido a la alta concentración de trombina utilizada en este kit, los niveles de heparina del plasma terapéutico no producen interferencias.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1. Precisión

Se realizaron estudios de precisión para establecer los CV intraanálisis y entre análisis para los controles normales y anormales. Los ensayos se llevaron a cabo mediante analizadores de coagulación fotoópticos y mecánicos.

<i>Normal</i>	<i>Intraanálisis</i>	<i>Entre análisis</i>
n	40	20
Media	272,7 mg/dL	275,8 mg/dL
DT	14,1 mg/dL	9,69 mg/dL
CV	3,55%	3,43%

<i>Anormal</i>		
n	40	20
Media	168,0 mg/dL	162,7 mg/dL
DT	5,4 mg/dL	8,02 mg/dL
CV	3,2%	4,81%

2. Comparación

Se realizó un estudio comparativo mediante el ensayo FibróTek y se utilizó un método comparativo sobre 110 muestras normales y anormales utilizando dos tipos distintos de analizadores de coagulación. Las ecuaciones de la regresión lineal y el coeficiente de determinación (r²) fueron los siguientes:

Fotoóptico		
n = 110	Y = 0,8592x + 8,565	r² = 0,9693
Mecánico		
n = 110	Y = 0,8479x + 21,941	r² = 0,9582

Y = kit FibróTek FIB

X = kit de referencia



R2 Diagnostics

South Bend, Indiana (574) 288-4377



MT Promedt Consulting GmbH

Ernst-Heckel-Straße 7, 66386 St. Ingbert, Germany

LL-4516 REV. F