

INTENDED PURPOSE

The Fibrinogen Assay Kit is intended for the quantitative determination of fibrinogen in human plasma. Clauss¹ developed a simple method for the quantitative determination of fibrinogen by measuring the clotting time of dilute plasma after the addition of thrombin (>30 NIH units/ml). This clot time is proportional to the fibrinogen concentration. Levels of fibrinogen can increase as a result of inflammation, pregnancy or oral contraceptive use². Decreased levels can be found in certain states such as liver disease and DIC. Congenital deficiencies include afibrinogenaemia (no detectable fibrinogen), hypofibrinogenaemia (<1 mg/ml) and dysfibrinogenaemia (abnormal fibrinogen molecule).

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The reagents contained in this kit are for in-vitro diagnostic use only. **DO NOT INGEST.** Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheets for risk and safety phrases and disposal information. Plasma products have been screened and found negative (unless otherwise stated on the kit box or vial) for the presence of Hepatitis B Antigen (HBsAg) HIV 1 and 2 antibody and HCV antibody; however they should be handled with the same precautions as a human plasma sample.

Not for use with the AC-4.**COMPOSITION****1. Thrombin Reagent (5 x 2ml)**

Contains approximately 200 units bovine thrombin with stabilisers.

Preparation: Reconstitute each vial with 2.0ml of purified water or kaolin suspension depending on manual or instrument specific methodology. Take care when pipetting to avoid contamination. Swirl gently and allow to stand for 15 minutes. Mix well immediately before use. Do not shake.

2. Fibrinogen (2 x 1ml)

Contains 1ml of lyophilised normal human plasma assayed for fibrinogen levels.

Preparation: Reconstitute each vial with exactly 1.0ml of purified water. Swirl gently and allow to stand for 10 minutes. Mix gently before use. Do not shake.

3. Owren's Veronal Buffer (2 x 25ml)

Contains 25ml of buffer which contains barbital and sodium chloride and sodium azide as preservative. The buffer is ready for use as packaged.

4. Kaolin Suspension 0.5g/l (2 x 5ml)

Contains 5ml of kaolin suspension at 0.5g/l

Preparation: Mix vigorously immediately before use.

Ensure no sedimentation is visible.

5. Other kit components

Each kit contains Instructions For Use and lot specific reference values insert.

STORAGE AND SHELF-LIFE

Unopened vials are stable until the given expiry date when stored under conditions indicated on the vial or kit label.

1. Thrombin Reagent

Once reconstituted, the reagent is stable for 8 hours at 15...30°C, 1 week at 2...6°C or 1 month at -20°C.

2. Fibrinogen Calibrator

Once reconstituted, the reagent is stable for 4 hours at 2...6°C.

3. Owren's Veronal Buffer

Store at 2...6°C once opened.

4. Kaolin suspension

Store at 2-6°C once opened.

The reagents contained in this kit are also available as separate items:

REF 5374	Thrombin Reagent	10x2ml
REF 5378	Thrombin Reagent	10x5ml
REF 5379	Fibrinogen Calibrator	10x1ml
REF 5375	Owren's Veronal Buffer	10x25ml
REF 5488	Owren's Veronal Buffer	1x500ml

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Plastic or siliconised glass should be used throughout. Blood

(9 parts) should be collected into 3.2% or 3.8% sodium citrate anticoagulant (1 part). Separate plasma after centrifugation at 2000 - 3000 x g for 15 minutes. Plasma should be kept at 2...6°C. Testing should be completed within 2 hours of sample collection, or plasma can be stored frozen at -20°C for 2 weeks or -70°C for one month. Thaw quickly at 37°C prior to testing. Do not keep at 37°C for more than 5 minutes.

STEP BY STEP PROCEDURE

Helena BioSciences Fibrinogen Assay reagents are suitable for use on any coagulation analyser capable of performing Clauss Fibrinogen assays. Refer to the Instrument Operators Manual and/or application note for appropriate instructions.

A. Manual Method

Prepare all reagents as instructed under 'composition'.

1. Standard Curve Preparation

Note: A new standard curve should be used when reagent lot numbers change or if expected values in quality control testing change.

Prepare the following dilutions in Owren's Veronal Buffer:

Tube	Dilution	Fibrinogen Calibrator (ml)	Buffer (ml)
1	1+4	0.2	0.8
2	1+9	0.1	0.9
3	1+19	0.1	1.9
4	1+29	0.1	2.9
5	1+39	0.1	3.9

Mix without shaking.

2. Patient Sample Preparation

Prepare 1+9 dilutions of the patient plasma or control plasma in Owren's Veronal Buffer. Mix without shaking.

3. Testing

Perform all tests in duplicate.

a) Pipette 0.2ml of standard, patient or control dilution into a reaction tube and incubate at 37°C for 2 minutes.

b) Add 0.1ml of Thrombin Reagent (15...30°C).

c) Determine the clot time to the nearest 0.1 seconds.

d) Plot mean Standard Clot Time (Y-axis) versus Fibrinogen Level (X-axis) on the Fibrinogen graph paper. A straight line should be obtained. Assign the Fibrinogen Calibrator reference value to the 1+9 dilution to allow direct interpolation of patient and control values from the standard curve.

B. Automated and semi-automated methods : Please see instrument specific application guides.

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program. Normal and abnormal control plasmas should be tested prior to each batch of patient samples, to ensure satisfactory instrument and operator performance. If controls do not perform as expected, patient results should be considered invalid.

Helena BioSciences supply the following controls available for use with this product:

REF 5301	Sac-1 Normal Control Plasma	10x1ml
REF 5302	Sac-2 Abnormal Control Plasma	10x1ml
REF 5186	Norm-Trol 1 Control Plasma	10x1ml
REF 5187	Ab-Trol 2 Control Plasma	10x1ml
REF 5183	Ab-Trol 3 Control Plasma	10x1ml

REFERENCE VALUES

Reference values can vary between laboratories depending on the techniques and systems in use. For this reason each laboratory should establish its own normal range. Expected values for fibrinogen in healthy adults are 150-350 mg/dl (1.5-3.5 g/L)^{3,4}

LIMITATIONS

Heparin levels >0.6 units/ml and fibrinolytic degradation products >100mg/ml may cause falsely low fibrinogen quantitation. If values fall outside the standard curve values for the patient samples, re-assay using an appropriate dilution to bring values into the standard range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Helena BioSciences or their representatives have determined the following performance characteristics as a guideline.

Each laboratory should establish its own performance data.

The Manual Fibrinogen assay is designed to give a linear calibration from 1.5 - 6.5g/L.

REPRODUCIBILITY:

Within assay reproducibility:
Fibrinogen (g/L) CV n
1.24 4.88 5
3.01 3.58 5

Between assay reproducibility:
Fibrinogen (g/L) CV n
1.02 6.17 10
3.62 3.78 10

BIBLIOGRAPHY

- Clauss, A., 'Gerinnungsphysiologische Schnell-methode zur bestimmung des Fibrinogens' Acta Haematol., 1957, 17 : 237-246.
- Shaw, T.S., 'Assays for Fibrinogen and its Derivatives' CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 1977, 8 : 145-192.
- Scully, R.E. et al., 'Normal Reference Laboratory Values', N. Eng. J. Med., 1980, 302(37) : 37-48.
- Okuno, T. and Selenko, V., Amer. J. Med. Tech., 1972, 38(6) : 196-201.

UTILISATION

Le kit de dosage du fibrinogène est utilisé pour la détermination quantitative du fibrinogène dans le plasma humain.

Clauss¹ a développé une méthode simple de détermination quantitative du fibrinogène en mesurant le temps de coagulation de plasma dilué après l'ajout de thrombine (>30 unités NIH/ml). Ce temps de coagulation est proportionnel à la concentration en fibrinogène. Le taux de fibrinogène peut augmenter en raison d'une inflammation, d'une grossesse ou de la prise de contraceptifs oraux. Des taux diminués sont trouvés dans certaines pathologies comme une maladie du foie ou une CIVD. L'afibrinogénémie (pas de fibrinogène détectable), l'hypofibrinogénémie (<1mg/ml) et la dysfibrinogénémie (molécule de fibrinogène anormale) sont des anomalies congénitales.

PRÉCAUTIONS

Les réactifs du kit sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. **NE PAS INGÉRER.** Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

Un dépistage des produits à base de plasma a été réalisé et a donné un résultat négatif (sauf indication contraire sur la boîte du kit ou sur le flacon) pour les antigènes de l'hépatite B (AGBs), les anticorps anti VIH 1 et 2 et les anticorps anti VHC; il est malgré tout nécessaire de les manipuler avec les mêmes précautions que pour les échantillons de plasma humain.

Ne doit pas être utilisé avec l'AC-4.**COMPOSITION****1. Réactif Thrombine (5 x 2ml)**

Chaque flacon contient environ 200 unités de thrombine bovine additionnée de stabilisateurs.

Préparation : Reconstituer chaque flacon avec 2,0 ml d'eau distillée ou de suspension de kaolin en fonction de la méthode utilisée : manuelle ou spécifique de l'instrument.

Bien mélanger juste avant utilisation.

2. Étalon Fibrinogène (2 x 1ml)

Chaque flacon contient 1ml de plasma humain normal lyophilisé dosé pour les taux de fibrinogène.

Préparation : Reconstituer chaque flacon avec exactement 1,0ml d'eau distillée. Agiter doucement et laisser reposer 10 minutes. Mélanger doucement avant utilisation. Ne pas agiter.

3. Tampon Véronal (2 x 25ml)

Chaque flacon contient 25ml de tampon contenant du barbital et du chlorure de sodium additionné d'azide de sodium comme conservateur. Le tampon est prêt à l'emploi.

4. Suspension de kaolin à 0,5 g/l (2 x 5 ml)

Contient 5 ml de suspension de kaolin à 0,5 g/l.

Préparation : Mélanger vigoureusement juste avant utilisation. S'assurer qu'il n'y a pas de sédimentation visible.

5. Autres composants du kit

Chaque kit contient une fiche technique et les valeurs de référence spécifiques du lot.

STOCKAGE ET CONSERVATION

Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée s'ils sont conservés dans les conditions indiquées sur l'étiquette du kit ou du flacon.

1. Réactif Thrombine

Une fois reconstitué, le réactif est stable 8 heures à température ambiante, 1 semaine entre 2...6°C ou 1 mois à -20°C.

2. Étalon Fibrinogène

Une fois reconstitué, le réactif est stable 4 heures entre 2...6°C.

3. Tampon Véronal de Owren

Conserver entre 2...6°C une fois ouvert.

4. Suspension de kaolin

Conserver entre 2 et 6 °C une fois ouvert.

Les réactifs du kit sont aussi disponibles séparément:

REF 5374	Réactif Thrombine	10 x 2ml
REF 537		

PRINCIPIO

Il kit di dosaggio del fibrinogeno è stato formulato per la determinazione quantitativa del fibrinogeno in plasma umano.
Clauss' ha messo a punto un semplice metodo per la determinazione quantitativa del fibrinogeno misurando il tempo di coagulazione del plasma diluito in seguito all'aggiunta di trombina (>30 NIH unità/ml). Questo tempo di coagulazione è proporzionale alla concentrazione di fibrinogeno. I livelli di fibrinogeno possono aumentare in seguito ad infiammazione, gravidanza o impiego di contraccettivi orali. Livelli ridotti di fibrinogeno sono riscontrabili in alcuni stati come ad esempio le patologie epatiche e la DIC. Tra le carenze congenite rientrano l'afibrinogenemia (assenza di fibrinogeno rilevabile), l'ipofibrinogenemia (<1 mg/ml) e la disfibrinogenemia (molecola di fibrinogeno anomala).

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I reagenti contenuti in questo kit sono destinati esclusivamente alla diagnostica in vitro - **NON INGERIRE**. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Fare riferimento alle istruzioni del prodotto per avvertenze su rischi e sicurezza ed informazioni sullo smaltimento dei componenti.

I prodotti plasmatici sono stati esaminati dando esito negativo (salvo diversamente indicato sulla confezione del kit o sul flacone) relativamente alla presenza dell'antigene dell'epatite B (HbsAg), dell'anticorpo anti-HIV 1 e 2 e dell'anticorpo anti-HCV; questi prodotti devono tuttavia essere manipolati con le stesse misure precauzionali adottate per un campione di plasma umano.

Da non utilizzare con AC-4.

COMPOSIZIONE**1. Reagente a base di trombina (5 x 2ml)**

Ogni flacone contiene approssimativamente 200 unità di trombina bovina con stabilizzatori.

Preparazione: Ricostituire ogni flacone con 2,0 ml di acqua distillata o sospensione di caolin a seconda della metodologia specifica del manuale o dello strumento.

2. Calibratore per fibrinogeno (2 x 1ml)

Ogni flacone contiene 1ml di plasma umano normale liofilizzato dosato per i livelli di fibrinogeno.

Preparazione: Ricostituire ogni flacone con esattamente 1,0ml di acqua distillata. Agitare delicatamente e lasciare riposare per 10 minuti. Miscelare delicatamente prima dell'uso. Non scuotere.

3. Tampone Veronal di Owren (2 x 25ml)

Ogni flacone contiene 25ml di tampone contenente barbital e sodio cloruro con sodio azide come conservante. Il tampone è pronto all'uso così come viene fornito.

4. Sospensione di caolin 0,5 g/l (2 x 5 ml)

Contiene 5 ml di sospensione di caolin a 0,5 g/l.

Preparazione: Miscelare energicamente immediatamente prima dell'uso.

Assicurarsi che non vi siano sedimenti visibili.

5. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale e un inserto recante i valori di riferimento specifici per il lotto.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I flaconi non aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata se conservati nelle condizioni riportate sul flacone o sull'etichetta del kit.

1. Reagente a base di trombina

Dopo la ricostituzione, il reagente è stabile per 8 ore a temperatura ambiente, 1 settimana a 2...6°C o per 1 mese a -20°C.

2. Calibratore per fibrinogeno

Dopo la ricostituzione, il reagente è stabile per 4 ore a 2...6°C.

3. Tampone Veronal di Owren

Una volta aperto, conservare a 2...6°C.

4. Sospensione di caolin

Conservare a 2-6°C dopo l'apertura.

I reagenti contenuti in questo kit sono disponibili anche come materiale separato:

REF 5374 Reagente a base di trombina 10x2ml

REF 5378 Reagente a base di trombina 10x5ml

REF 5379 Calibratore per fibrinogeno 10x1ml

REF 5375 Tampone Veronal di Owren 10x25ml

REF 5488 Tampone Veronal di Owren 1x500ml

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Nel corso dell'intera procedura è necessario utilizzare plastica o vetro siliconizzato. Il sangue (9 parti) deve essere raccolto in sodo citrato al 3,2% o al 3,8% come anticoagulante (1 parte). Separare il plasma in seguito a centrifugazione a 2000 - 3000 x g per 15 minuti. Il plasma deve essere conservato a 2...6°C. I test devono essere completati entro 2 ore dalla raccolta dei campioni; in alternativa, il plasma può essere conservato congelato a -20°C per 2 settimane o a -70°C per 1 mese. Decongelare rapidamente a 37°C prima di eseguire il test. Non conservare a 37°C per oltre 5 minuti.

PROCEDURA

I reagenti di dosaggio del fibrinogeno Helena BioSciences sono idonei all'uso in qualsiasi analizzatore di coagulazione in grado di eseguire i dosaggi del fibrinogeno di Clauss. Fare riferimento al manuale utente dello strumento e/o alla nota applicativa per conoscere le istruzioni specifiche.

A. Metodo manuale

Preparare tutti i reagenti secondo le istruzioni riportate nel paragrafo COMPOSIZIONE.

1. Preparazione della curva standard

NOTA: Quando i numeri di lotto dei reagenti cambiano o se i valori previsti per i test del controllo qualità variano, è necessario utilizzare una nuova curva standard. Preparare le seguenti diluizioni nel tampone Veronal di Owren:

Provetta	Diluizione	Calibratore fibrinogeno (ml)	Tampone (ml)
1	1+4	0.2	0.8
2	1+9	0.1	0.9
3	1+19	0.1	1.9
4	1+29	0.1	2.9
5	1+39	0.1	3.9

Miscelare senza scuotere.

2. Preparazione dei campioni dei pazienti

Preparare 1+9 diluizioni di plasma del paziente o di plasma di controllo nel tampone Veronal di Owren. Miscelare senza scuotere.

3. Esecuzione del test

Eseguire tutti i test per 2 volte.

- a) Pipettare 0,2ml di diluizione standard, del paziente o di controllo in una provetta di reazione ed incubare a 37°C per 2 minuti.
- b) Aggiungere 0,1ml di reagente a base di trombina (15...30°C).
- c) Determinare il tempo di coagulazione standard medio (sull'asse Y) rispetto al livello di fibrinogeno (sull'asse X) sulla carta diagrammata del fibrinogeno.

Si dovrà ottenere una linea retta. Assegnare il valore di riferimento del calibratore per fibrinogeno alla diluizione 1+9, per consentire l'interpolazione diretta dei valori del paziente e di controllo dalla curva standard.

B. Metodi automatici e semi-automatici: Consultare le guide di applicazione specifiche dello strumento.**CONTROLLO QUALITÀ**

Ogni laboratorio deve definire un programma di controllo qualità. I plasmi di controllo normali e anormali devono essere testati prima di ogni lotto di campioni di pazienti, per garantire un livello prestazionale soddisfacente sia per quanto riguarda lo strumento che per l'operatore. Qualora i controlli non funzionassero come previsto, i risultati relativi ai pazienti dovranno essere considerati non validi.

Helena BioSciences mette a disposizione i seguenti controlli utilizzabili con questo prodotto:

REF 5301 Sac-1 Plasma di controllo normale 10x1ml

REF 5302 Sac-2 Plasma di controllo anormale 10x1ml

REF 5186 Norm-Trol 1 Plasma di controllo 10x1ml

REF 5187 Ab-Trol 2 Plasma di controllo 10x1ml

REF 5183 Ab-Trol 3 Plasma di controllo 10x1ml

VALORI DI RIFERIMENTO

I valori di riferimento possono variare da un laboratorio all'altro in funzione delle tecniche e dei sistemi in uso. Per tale motivo ciascun laboratorio dovrà elaborare un proprio range normale. Nei soggetti adulti sani i valori previsti per il fibrinogeno sono di 150-350 mg/dl (1,5-3,5 g/L)⁴.

LIMITAZIONI

I livelli di epatina >0,6 unità/ml e i prodotti fibrinolitici di degradazione >100mg/ml possono causare una quantificazione del fibrinogeno falsamente bassa. Se i valori fuoriescono dai valori della curva standard per i campioni dei pazienti, ripetere il dosaggio utilizzando una diluizione appropriata per portare i valori all'interno del range standard.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le caratteristiche prestazionali sotto riportate sono state determinate da Helena BioSciences o dai propri rappresentanti a titolo di linee guida.

Ciascun laboratorio dovrà pertanto elaborare i propri dati prestazionali.

Il dosaggio fibrinogeno manuale è concepito per offrire una calibrazione lineare da 1,5-6,5 g/L.

RIPRODUCIBILITÀ:

Riproducibilità entro il dosaggio:

Fibrinogeno (g/L)	CV	n
1.24	4.88	5
3.01	3.58	5

Riproducibilità tra i dosaggi:

Fibrinogeno (g/L)	CV	n
1.02	6.17	10
3.62	3.78	10

BIBLIOGRAFIA

1. Clauss, A., Gerinnungsphysiologische Schnell-methode zur bestimmung des Fibrinogens' Acta Haematol., 1957, 17: 237-246.
2. Shaw, T.S., Assays for Fibrinogen and its Derivatives' CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 1977, 8 :145-192.
3. Scully, R.E. et al., Normal Reference Laboratory Values', N. Eng. J. Med., 1980, 302(37) : 37-48.
4. Okuno, T. and Selenko, V., Amer. J. Med. Tech., 1972, 38(6) : 196-201.

USO PREVISTO

El Kit de valoración del fibrinógeno está previsto para la determinación cuantitativa del fibrinógeno en el plasma humano. Clauss' desarrolló un método simple para la determinación cuantitativa de fibrinógeno midiendo el tiempo de coagulación del plasma diluido después de la adición de trombina (>30 unidades NIH/ml). Este tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de fibrinógeno. Los niveles de fibrinógeno pueden aumentar como consecuencia de inflamación, embarazo o uso de anticonceptivos orales. Pueden encontrarse niveles disminuidos en determinados estados como la hepatopatía y la CID. Entre las deficiencias congénitas están la afibrinogenemia (sin fibrinógeno detectable), la hipofibrinogenemia (<1mg/ml) y la disfibrinogenemia (molecula de fibrinógeno anormal).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los reactivos contenidos en este kit son sólo para uso diagnóstico – **NO SE DEBEN INGERIR**. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos, avisos de seguridad y consejos para su eliminación. Los productos plasmáticos se han sometido a pruebas y han resultado negativos (a menos que se indique otra cosa en la caja del kit o en el vial) para la presencia de anticuerpos de hepatitis B (HbsAg), anticuerpos de VIH 1 y 2 y anticuerpo del VHC; sin embargo, deberá manipularse con las mismas precauciones que una muestra de plasma humano.

No debe usarse con el AC-4.

COMPOSICIÓN**1. Reactivo de trombina (5 x 2ml)**

Cada vial contiene aproximadamente 200 unidades de trombina bovina con estabilizadores.

Preparación: Recostituir cada vial con 2,0 ml de agua purificada o suspensión de Kaolin dependiendo de la metodología específica manual o de cada instrumento.

Mezclar bien inmediatamente antes de usar.

2. Calibrador del fibrinógeno (2 x 1ml)

Cada vial contiene 1ml de plasma humano normal liofilizado estudiado en cuanto a niveles de fibrinógeno.

Preparación: Reconstruir cada vial con exactamente 1,0ml de agua destilada. Agitar suavemente y permitir que reposen durante 10 minutos. Mezclar suavemente antes de su uso. No agitar.

3. Támpón Veronal de Owren (2 x 25ml)

Cada frasco contiene 25ml de támpón con barbital y cloruro sódico con azida sódica como conservante. El támpón viene envasado listo para usar.

4. Suspensión de kaolin 0,5 g/l (2 x 5 ml)

Contiene 5 ml de suspensión de kaolin a 0,5 g/l.

Preparación: Mezclar vigorosamente inmediatamente antes de usar. Comprobar que no hay sedimentación visible.

5. Otros componentes del kit

Cada kit contiene instrucciones de uso y valores de referencia específicos insertados del lote.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ