

Quantitative determination of Fibrinogen IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Fibrinogen in presence of an excess of thrombin concentration, changes into Fibrin.

The time for clot formation in dilute plasma is inversely proportional to the fibrinogen concentration in the sample.

The thrombin clotting time fibrinogen assay is based on the method originally described by Claus.¹ In the presence of high concentrations of thrombin, the time required for clot formation in dilute plasma is inversely proportional to the fibrinogen concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Fibrinogen (Factor I), protein synthesized by the liver, is the substance used in the blood to form a clot. Its determination is used to evaluate abnormal blood clotting.

Elevated Fibrinogen levels are observed in acute inflammations and in pregnancy; low values are observed in trombotic therapy, in hepatic disease, in the congenital non fibrinogen, in DIC (Disseminated Intravascular Coagulation) and in pancreatitis (low values)¹.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1	Bovine thrombin	≈ 100 NIH u /mL
R 2	Imidazole Buffer	
R3	Caolin Solution	
Optional	COAGULATION CAL	REF: 1709101
	CONTROL NORMAL	REF: 1709104
	CONTROL PATHOLOGIC	REF: 1709106

PREPARATION

R1: Dissolve (→) the contents with 2.0 mL of distilled water. Cap vial and mix gently to dissolve contents. Stability: 7 days at 2-8°C or 1 month at -20°C, if immediately frozen and stored in the original container. Do not re-freeze.

R2: Mix before use.

R3: Ready for use reagent.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Quality control values outside established ranges.
- Product colour variations.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Coagulometer or stopwatch and bath at 37°C ± 0.5°C.
- General laboratory equipment^(Note 1).

SAMPLES

Plasma from venous puncture diluted 1/10 in trisodium citrate solution 3.8% (105 mmol/L).

Mixing immediately the blood with anticoagulant. Avoid foaming the specimen.

Centrifuge the sample at 3000 x g for 10 min and transfer the plasma to siliconized glass or plastic containers.

Turbid, icteric, lipemic or hemolyzed samples may generate erroneous results.

The sample is stable for 4 hours at room temperature (15-25°C) or 28 days if immediately frozen at below 20°C.

NOTES

1. All labware must be clean and free of trace amounts of detergents.
2. Always follow instrument manufacturer's instructions; the results must be validated by the test laboratory.

PROCEDURE

The reagent can be used by manual procedure, mechanical, photo-optical or other means of end clot detection^(Note 2).

1. Dilute the citrated plasma and Control 1/10 with Imidazole buffer: 50 µL plasma + 450 µL Imidazole buffer.
The diluted sample must be processed in 1 hour.

2. Prepare the following dilutions of the Calibrator in Imidazole buffer.

Calibrator Dilution	1/40	1/30	1/20	1/10	1/5
IMIDAZOLE BUFFER (mL)	3.9	2.9	1.9	0.9	0.4
COAGULATION CAL (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Factor	10/40*	10/30*	10/20*	10/10*	10/5*
Concentration (mg/dL)	0.25* x c	0.33* x c	0.5* x c	1* x c	2* x c

(c = Calibrator value)

3. Add 20 µL of R3 to 0.2 mL of each dilution, and allow to reach 37°C for 4-6 minutes.
4. Add 0.1 mL of R1 and time clot formation. Do not prewarm thrombin R1.

Calculations

1. Calculate the mean of duplicate clotting times immediately after reaction. Use all five of the calibrator points to construct a log-log curve that plots fibrinogen concentration (mg/dL) vs. clotting time (s).
2. Draw the straight line of best fit. Examine the curve and, if necessary, omit non-linear points. The final curve must consist of at least three consecutive points. Constructing the curve with only the most linear points will produce the best recovery on control and patient samples.
3. The following curve is **only orientative**. It will change with lot and concentration of the calibrator, a well as, with the instrument used.

Time (s)	Concentration (mg/dL)	Concentration (g/L)
18.1	608	6.08
26.4	304	3.04
49.6	152	1.52
84.7	76	0.76
153	38	0.38

4. Find the clotting time of quality control and patient samples on the curve and read the corresponding fibrinogen value.
5. If clotting times for the 1/10 dilution fall outside the linear curve, prepare 1/5 or 1/20 dilutions as needed. If the sample is diluted 1/5, divide the result from the standard curve by 2; if the sample was diluted 1/20, multiply the curve result by 2 to get the final result.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures:

CONTROL NORMAL REF: 1709104

CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES

200 - 400 mg/dL¹ (2.00 - 4.00 g/L)

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision:

	Inter-assay (n=30)		
Mean (U/L)	144	294	488
CV (%)	5.9	3.4	2.9

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents did not show systematic differences when compared with other commercial reagents.

INTERFERENCES AND LIMITATIONS

Has been observed interferences in samples with fibrinogen degradation.

Acute inflammatory reactions can elevate circulating fibrinogen. Hemolysis can cause clotting factor activation and end point detection interference. High paraprotein levels, and drugs that activate the fibrinolytic system can interfere with fibrinogen assays. A list of drugs and other interfering substances with the determination has been reported^{2,3}.

BIBLIOGRAPHY

1. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
2. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
3. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.

PRESENTACION

Ref: 1709211	Cont.	R1 8 x 2 mL
		R2 1 x 100 mL
		R3 1 x 3.5 mL

Determinación cuantitativa de Fibrinógeno

IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Fibrinógeno, en presencia de un exceso de trombina, se transforma en Fibrina.

El tiempo de formación del coágulo es inversamente proporcional a la concentración de Fibrinógeno presente en la muestra de plasma.

La determinación de fibrinógeno por el tiempo de coagulación de trombina, está basada en el método descrito por Clauss¹. En presencia de altas concentraciones de trombina, el tiempo necesario para la formación del coágulo en el plasma diluido es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno.

SIGNIFICADO CLÍNICO

El Fibrinógeno (Factor I), proteína sintetizada en el hígado, es un componente de la sangre utilizado para formar el coágulo. Su determinación nos ayuda a evaluar las alteraciones en los mecanismos de coagulación.

La concentración de fibrinógeno se incrementa en inflamaciones agudas y embarazo; por el contrario se observan valores bajos en terapias trombolíticas, enfermedades hepáticas, disfibrinogenia congénita, DIC (Coagulación intravascular diseminada) y pancreatitis¹.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Trombina bovina	≈ 100 u NIH/mL
R 2	Tampón Imidazol	
R3	Solución Caolín	
Opcional	COAGULATION CAL	REF: 1709101
	CONTROL NORMAL	REF: 1709104
	CONTROL PATHOLOGIC	REF: 1709106

PREPARACIÓN

R1: Reconstituir (→) en 2,0 mL de agua destilada. Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido. Estabilidad: 7 días a 2-8°C o 1 mes a -20°C, si se congela inmediatamente y se conserva en el frasco original. No volver a congelar.

R2: Agitar antes de usar.

R3: Listo para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C y se evita su contaminación.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Resultados en el Control de calidad fuera de los rangos establecidos.
- Variaciones de color.

MATERIAL ADICIONAL

- Coagulómetro o cronómetro y baño a 37°C ± 0,5°C.
- Equipamiento habitual de laboratorio^(Nota 1).

MUESTRAS

Plasma obtenido por punción venosa diluido 1/10 en solución de citrato trisódico 3,8% (105 mmol/L).

Mezclar inmediatamente la sangre con el anticoagulante. Evitar la formación de espuma.

Centrifugar la muestra a 3000 x g 10 min y transferir el plasma.

Usar sólo contenedores de vidrio siliconado o plástico.

Los plasmas turbios, ictericos, lipémicos o hemolizados pueden dar resultados erróneos.

La muestra es estable 4 horas a temperatura ambiente (15-25°C) o 28 días si se congela inmediatamente a -20°C.

NOTAS

1. El material de laboratorio usado debe estar libre de restos de detergente.
2. Seguir minuciosamente las instrucciones del fabricante del instrumento, los resultados obtenidos deben ser validados por el laboratorio.

PROCEDIMIENTO

El reactivo puede emplearse en técnica manual, mecánica, fotoóptica o con cualquier instrumento apto para detectar la formación del coágulo^(Nota 2).

1. Preparar una dilución 1/10 de la muestra y los Controles en Tampón Imidazol: 50 µL muestra + 450 µL Tampón Imidazol.
La muestra diluida debe ser procesada antes de 1 hora.
2. Preparar las siguientes diluciones del Calibrador en Tampón Imidazol:

Dilución del Calibrador	1/40	1/30	1/20	1/10	1/5
Tampón Imidazol (mL)	3.9	2.9	1.9	0.9	0.4
COAGULATION CAL (mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Factor	10/40*	10/30*	10/20*	10/10*	10/5*
Concentración (mg/dL)	0.25* x c	0.33* x c	0.5* x c	1* x c	2* x c

(c = Valor del Calibrador)

3. A 0,2 mL de cada dilución añadir 20 µL de R3 y atemperar a 37°C durante 4-6 minutos.

4. Añadir 0,1 mL de reactivo R1 y cronometrar la formación de coágulos. No atemperar la trombina R1.

CÁLCULOS

1. Calcular la media de los duplicados de los tiempos de coagulación, inmediatamente después de finalizar la reacción. Utilizar los cinco puntos del calibrador para crear una curva de los tiempos obtenidos (s) frente a los valores de concentración de Fibrinógeno de cada dilución del Calibrador (mg/dL).
2. Trazar la mejor curva. Examinar la curva y, si es necesario, omitir los puntos no lineales. La curva final debe constar de tres puntos consecutivos como mínimo. La creación de la curva sólo con los puntos más lineales producirá la mejor recuperación en los controles y las muestras de paciente.
3. La siguiente curva de calibración es sólo **orientativa**, variando en función del lote y concentración del calibrador, así como del instrumento utilizado.

Tiempo (s)	Concentración (mg/dL)	Concentración (g/L)
18.1	608	6.08
26.4	304	3.04
49.6	152	1.52
84.7	76	0.76
153	38	0.38

4. La concentración de Fibrinógeno en la muestra se calcula por interpolación de su tiempo de coagulación en la curva de calibración. La dilución 1/10 del plasma representa el 100% del valor asignado.

5. Si los tiempos de dilución 1/10 se encuentran fuera de la curva lineal, preparar diluciones a 1/5 ó 1/20, según sea necesario. Si la muestra se diluye a 1/5 dividir el resultado de la curva por 2; si la muestra se diluye a 1/20, multiplicar el resultado por 2 para obtener el resultado final.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

CONTROL NORMAL REF: 1709104

CONTROL PATHOLOGIC REF: 1709106

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos o la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

200 - 400 mg/dL¹ (2.00 - 4.00 g/L)

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Precisión:

	Interserie (n= 30)		
Media (U/L)	144	294	488
CV (%)	5,9	3,4	2,9

Exactitud: Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES

Se han observado interferencias relevantes en muestras con productos de degradación del Fibrinógeno. Las reacciones inflamatorias agudas pueden aumentar el fibrinógeno circulante. La hemólisis puede causar activación de los factores de coagulación e interferir en la detección del punto final. Los niveles altos de paraproteína, y de fármacos que activan el sistema fibrinolítico pueden interferir en las determinaciones de fibrinógeno. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en su determinación^{2,3}.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
2. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
3. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.

PRESENTACIÓN

Ref: 1709211	Cont.	R1 8 x 2 mL
		R2 1 x 100 mL
		R3 1 x 3.5 mL