



LIAPHEN® Fibrinogen

Ref. Nr. 120102

Turbidimetrischer Latex-Immunistest zur quantitativen

Bestimmung von Fibrinogen im Plasma

In-vitro-Diagnostikum



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny, F. 95000 Neuville-sur-Oise

Tel. +33-1-3440 6510 | Fax +33-1-3448 7236

Vertrieb: www.coachrom.com

CoaChrom Diagnostica GmbH

Stolzenthalgasse 6, A 1080 Wien

Kostenfreie Nummern für Deutschland:

Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

Tel. +43-1-699 97 97 | Fax +43-1-699 18 97

Revision: 03/03/2011

VERWENDUNGSZWECK:

LIAPHEN® Fibrinogen ist ein Latex-Immunistest zur quantitativen Bestimmung von Fibrinogen in humanem Citratplasma mit automatisierten oder manuellen Methoden.

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Bestimmung eines Fibrinogenmangels bzw. Bestimmung von erhöhten Fibrinogenkonzentrationen im Plasma mittels Immunistest.

PROBENMATERIAL:

Humanes Citratplasma

Zellkulturüberstände

Gereinigte Präparationen, in denen Fibrinogen gemessen werden sollen.

TESTPRINZIP:

LIAPHEN® Fibrinogen ist ein turbidimetrischer Latex-Immunistest zur *In-vitro* Bestimmung von Fibrinogen. Das Latexreagenz enthält Partikel, die mit einem polyklonalen Kaninchen Anti-human Fibrinogen Antikörper beschichtet sind. Wird die Testprobe mit dem Latexreagenz (R1) vermischt, bindet in der Probe vorhandenes Fibrinogen an die Anti-Fibrinogen Antikörper auf den Latexpartikel und es kommt zu einer Agglutination. Die Menge der Agglutination ist proportional dem Gehalt an Fibrinogen in der Probe. Die Agglutination wird durch Lichtabsorption bei 620 nm gemessen.

Latex + Fibrinogen → Aggregation (A620nm,...)

IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

Jede Testpackung enthält:

- Reagenz 1 (R1), Latex Reagenz:

4 Flaschen mit je 5 ml Latex Mikropartikel beschichtet mit polyklonalen Kaninchen anti-(h)-Fibrinogen Antikörpern. Enthält BSA und Natriumazid (0,9 g/L). Gebrauchsfertig.

ACHTUNG: Bovines Serumalbumin (BSA) wurde aus bovinem Plasma hergestellt, das auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen wurde. Kein Test kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Jedes Produkt biologischen Ursprungs muss deshalb mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden. Natriumazid (0,9 g/L) kann mit Blei oder Kupferarmaturen unter Bildung hoch explosiver Metallazide reagieren. Bei Entsorgung der Lösung in den Abfluss muss mit großer Menge Wasser nachgespült werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Tris-NaCl-BSA 1% pH 7,5 Puffer (TBSA), Art.Nr. AR005A
- Plasmakalibrator für Fibrinogen (BIOPHEN® Kalibrationsplasma Gerinnung, Art.Nr. 222101) oder Internationales oder internes Referenzmaterial für Fibrinogen
- Normal und Abnormal Kontrollplasmen für Fibrinogen (BIOPHEN® Kontrollplasma Gerinnung „Normal“, Art.Nr. 223201, BIOPHEN® Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“, Art.Nr. 223301):

Geräte:

- Spectrophotometer, Wellenlänge 620 nm, Photometer oder Gerinnungsanalyser für chromogene Tests
- Stoppuhr
- Kalibrierte Pipetten
- Küvetten oder Mikrotiterplatte

RÜCKFÜHRBARKEIT DES STANDARDS:

Die Konzentration des internen Standards für Fibrinogen wurde mit einem Gerinnungstest (Fibrinogen) gegen den sekundären Standard SSC/ISTH Lot 3 NIBSC bestimmt. Es gab keine Abweichungen der Konzentration gemessen mit dem Gerinnungstest und dem LIAPHEN® Fibrinogen (immunologische Bestimmung).

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8 °C in der Originalverpackung gelagert werden und sind bis zum, auf dem Etikett aufgedruckten, Verfalldatum stabil.

Anmerkung: Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

- **R1 Latex Reagenz:** 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Den Inhalt vor jedem Gebrauch homogenisieren.

Stabilität des Reagenz nach dem Öffnen:

- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C)
- 6 Monate bei 2-8°C

Vorsichtsmaßnahmen:

- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzien nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, jegliche Kontamination oder Verdunstung während der Verwendung ist zu vermeiden.
- Die - bei Hyphen BioMed verfügbaren - gerätespezifischen (Gerinnungsanalyser) Angaben zum Testablauf sind zu beachten.

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109M (oder 0,129M) Trinitrium-Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 2500 g wird der Plasmaüberstand abgenommen.

Das Citratplasma sollte innerhalb folgender Zeitspannen gemessen werden:

- 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
- Bei -20°C oder tiefer kann das Plasma für bis zu 6 Monate gelagert und kurz vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen bei Raumtemperatur (18-25°C) innerhalb von 4 Stunden getestet werden.

Anmerkung: Weitere Empfehlungen für die Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind den GEHT und NCCLS/CLSI Dokumenten zu entnehmen. Ikerische, hämolytierte, lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

TESTDURCHFÜHRUNG:

LIAPHEN® Fibrinogen kann sowohl kinetisch an einem automatisierten Gerinnungsanalyser, als auch mit der manuellen Methode durchgeführt werden. Applikationen für die gängigsten Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Die manuelle Methode muss bei einer kontrollierten Temperatur von 37°C durchgeführt werden. Die Agglutinationsentwicklung wird bei 620 nm gemessen.

Kalibrationskurve:

Zur Erstellung der Kalibrationskurve kann ein kommerziell verfügbarer Kalibrator titriert für Fibrinogen (BIOPHEN® Kalibrationsplasma Gerinnung, Art.Nr. 222101) oder auch ein Internationaler oder interner Standard für Fibrinogen bzw. gereinigtes Fibrinogen verwendet werden.

Bei Verwendung eines kommerziell verfügbaren Plasmakalibrators oder gereinigten Fibrinogens mit einer bekannten Fibrinogenkonzentration (C) in µg/ml erhält man den höchsten Kalibrationspunkt (20 µg/ml) durch Verdünnung des Kalibrators mit dem Faktor D = 20:C. Beispiel: Bei einer Fibrinogenkonzentration (C) im Plasmakalibrator von 3.000 µg/ml wird er Verdünnungsfaktor (D) wie folgt ermittelt: D = 3.000:20 = 150.

Die weiteren Kalibrationspunkte werden durch Verdünnung der Fibrinogenlösung (3 ml) mit 20 µg/ml (C1) mit Tris-NaCl-BSA pH 7,5 (TBSA) hergestellt.

Standard	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Fibrinogen (µg/ml)	20	15	10	5	2,5	0
Menge Fibrinogenstandard	1000 µl C1	750 µl C1	500 µl C1	250 µl C1	125 µl C1	0 µl
Menge TBSA	0 µl	250 µl	500 µl	750 µl	875 µl	1000 µl

Um eine optimale Testleistung zu erzielen und den Abbau von Fibrinogen und somit falschen Ergebnissen zu vermeiden, ist die Kalibrationskurve unmittelbar vor dem Testlauf herzustellen.

Plasmaproben oder Kontrollen

Die Plasmaproben und Kontrollplasmen (bis zu 6 g/L) werden 1:300 mit TBSA vorverdünnt. Bei pathologischen Proben (stark erhöhte oder erniedrigte Fibrinogenkonzentration) muss die Verdünnung so gewählt werden, dass die Fibrinogenkonzentration nach der Verdünnung zwischen 5 und 20 µg/ml liegt. Beispiel: bei einer Hyperfibrinogenämie (6 bis 20 g/ml) muss die Probe 1:1000, bei einer Hypofibrinogenämie (< 1 g/ml) 1:100 verdünnt werden. Bei der Testung von Zellüberständen muss die Konzentration mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt werden. Die verdünnten Proben müssen innerhalb von zwei Stunden getestet werden.

TESTPROTOKOLL

Manuelle Methode:

In ein Teströhrchen oder eine Küvette wird zugegeben:

100 µl Kalibrationsplasma, Kontrollplasma oder Probenplasma
100 µl Latex Reagenz (R1), vorgewärmt auf 37°C

15 Minuten bei 37°C inkubieren:

Mischen und die Absorption bei 620 nm gegen TBSA messen.

Anmerkung: Bei Verwendung der manuellen Methode muss bei jedem Testlauf eine Kalibrationskurve erstellt werden. Es können auch andere Wellenlängen (405 bis > 700 nm) verwendet werden. Je höher die Wellenlänge desto niedriger ist der Blank und die Absorption der Plasmalipide. Die Testreaktion ist dabei erniedrigt.

Automatisierte Methoden:

Anleitungen für Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird dann kinetisch durchgeführt. Je nach Automat können die Rekonstitutionsvolumina abweichen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentrationen im Testansatz) genau eingehalten werden.

QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht, bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen, die Validierung der Kalibrationskurve und der homogenen Reaktivität von Analyse zu Analyse. Die Kalibrationskurve ist gültig, wenn die Konzentrationen der gemessenen Kontrollen innerhalb des Vertrauensbereichs liegen. Es sind verschiedene Qualitätskontrollplasmen für Fibrinogen verfügbar: BIOPHEN® Kontrollplasma Gerinnung „Normal“ (Art.Nr. 223201) und Kontrollplasma „Abnormal“ (Art.Nr. 223301). Jedes Labor sollte unter den jeweiligen Arbeitsbedingungen für jede neue Reagenzcharge die Zielwerte und Vertrauensbereiche verifizieren und falls notwendig anpassen.

Anmerkung:

- Für jede Testserie kann eine neue Kalibrationskurve erstellt werden, jedenfalls ist diese für neue Reagenzchargen, nach Wartungsarbeiten am Analysengerät oder wenn die gemessenen Werte der Kontrollen nicht im Vertrauensbereich für die jeweilige Methode liegen (nach Kontrolle aller Parameter des Messsystems) zu erstellen.
- Jedes Labor kann seine eigenen Zielwerte und Vertrauensbereiche in Abhängigkeit der verwendeten Reagenzien, Chargen, Geräte und Protokolle definieren und validieren.

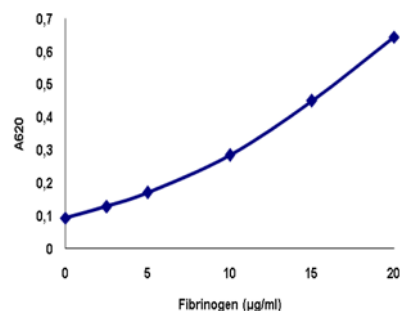
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE:

Auf Millimeterpapier wird die Fibrinogen Konzentration (µg/ml) auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption (A620 nm) auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Bei Verwendung einer Auswertesoftware sollte der Kurventyp verwendet werden, der am besten zu den Ergebnissen passt (Polynom 3. Ordnung, Akima,...). Die Kalibration ist gültig, wenn die Linearität $\geq 0,98$ ist und die Kontrollen im angegebenen Vertrauensbereich liegen.

Zur Berechnung der Fibrinogenkonzentration in der Probe muss die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden (Verdünnung 1:300, Ergebnis muss mit 300 multipliziert werden).

BEISPIEL FÜR EINE KALIBRATION:

Die nachfolgend gezeigte Kalibrationskurve, erstellt mit der manuellen Methode, dient lediglich als Beispiel. Zur Ergebnisberechnung von Proben dürfen ausschließlich die für die jeweilige Analysenserie gemessenen Kalibrationskurven verwendet werden.



TESTCHARAKTERISTIK:

Messbereich: 0 bis 20 µg/ml humanes Fibrinogen in der verdünnten Testlösung mit der manuellen Methode.

Nachweisgrenze: < 1 µg/ml (0,2 µg/ml in der verdünnten Probe), definiert als die niedrigste Konzentration mit einem VK von 20% bei N=15.

Spezifität: in Seren wurden Konzentrationen kleiner 0,2 µg/ml gemessen.

Präzision: 3 Plasmen mit hoher, mittlerer und niedriger Fibrinogenkonzentration wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen je zweimal pro Tag gemessen:

	Fibrinogenkonzentration (g/L)	Wiederholbarkeit innerhalb der Analyse	Gesamtpräzision
Level 3	5,04	3,8%	7,7%
Level 2	2,58	3,1%	9,8%
Level 1	1,31	3,4%	9,8%

Methodenvergleich:

Der Vergleich mit Fibrigen (Fibrinogen Gerinnungstest, Art.Nr. CK575K, Hyphen BioMed) ergab folgende Ergebnisse:

N=69 Y=0,97X - 0,06 R=0,977

Der Vergleich mit Multifibren® (Siemens), durchgeführt am BCS (Siemens) ergab folgende Ergebnisse:

N=96 Y=1,02X + 0,19 R=0,958

Kreuzreaktivität:

Der LIAPHEN® Fibrinogen reagiert auch mit Fibrinogen Fragment D, Fragment DD (D-Dimer) und Fibrinogenabbauprodukten (FDPs) im Plasma oder gereinigten Präparationen. Es gibt keine Kreuzreaktivität mit Fibrin Fragment E.

Hook Effekt bei hohen Dosen:

Es wurde keine Hook Effekt bei Konzentrationen unter 90 µg/ml (entspricht 18 g/L in der Testprobe, gemessen am STA-R und 27 g/L mit der manuellen Methode), bei Verwendung der Standardplasmaverdünnung festgestellt.

Testeinschränkungen:

Keine Beeinflussung des Tests durch Unfraktioniertes Heparin (UFH) oder Niedermolekulares Heparin (LMWH) ≤ 2 IE/ml, Bilirubin $\leq 0,2$ g/L, Hämoglobin ≤ 2 g/L, Intralipid $\leq 0,75$ % (entspricht 20 g/L Triglyzerid). Die Anwesenheit von Rheumafaktor führt wahrscheinlich zu einer erhöhten Fibrinogenkonzentration. Bei Patienten unter thrombolytischer Therapie muss die Probengewinnung mit einem, dem Antikoagulanzen zugesetzten Plasmininhibitor (zB Aprotinin) erfolgen.

ÜBLICHE WERTE UND PATHOLOGISCHE ABWEICHUNGEN:

Der Referenzbereich im Normalplasma gemessen am STA-R (N=56 gesunde Personen) liegt zwischen 1,9 und 4,3 g/l Fibrinogen. Systematische Abweichungen von diesem Bereich für die jeweiligen Automaten sind möglich. Jedes Labor sollte sich seinen eigenen Referenzbereich festlegen. Niedrige Fibrinogenkonzentrationen können in folgenden klinischen Situationen beobachtet werden: akutes Lebersversagen, angeborene Afibrinogenämie oder Hypofibrinogenämie, disseminierte, intravaskuläre Gerinnung, Primärfibrinolyse, Sekundärfibrinolyse, Therapie mit Thrombolytika (Streptokinase, Urokinase, tPA, L-Asparaginase). Erhöhte Fibrinogenkonzentrationen (> 5 mg/ml) in klinischen Situationen werden häufig im Zusammenhang mit Entzündungen beobachtet.

ERGÄNZENDE INFORMATIONEN:

Fibrinogen ist ein Glykoprotein mit 340 kD. Es besteht aus 6 Peptidketten, die mit Disulfidbrücken (2 α_2 2 β und 2 γ) symmetrisch verbunden sind. Thrombin aktiviert Fibrinogen zu Fibrin, welches durch FXIIIa in Anwesenheit von Kalzium stabilisiert wird. Fibrinogen wird durch Plasmin abgebaut. Zuerst entstehen dabei die Fragmente X und Y, danach D und E.

LITERATUR:

1. Lord ST. Fibrinogen. In: Molecular basis of thrombosis and haemostasis. High KA and Roberts HR. ed. Marcel Dekker Inc, 1995: 51-74.
2. Mosesson MW. Fibrinogen structure and fibrin clot assembly. Sem Thromb Hemost 1998; 24 (2): 169-174
3. Henschen-Edman AH. On the identification of beneficial and detrimental molecular forms of fibrinogen. Haemostasis 1999; 29 (2-3): 179-186