



Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
 www.coachrom.com | info@coachrom.com
 Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
 Kostenfreie Nummern für Deutschland:
 Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

Turbidimetrischer Latex-Immunotest zur quantitativen Bestimmung von Fibrinogen im Plasma

In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK:

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

KLINISCHE BEDEUTUNG:

Diagnose eines Fibrinogenmangels bzw. Bestimmung von erhöhten Fibrinogenkonzentrationen in Plasma mittels Immunotest.

PROBENMATERIAL:

Humanes Citratplasma, Zellkulturüberstände oder gereinigte Präparationen, in denen Fibrinogen gemessen werden soll.

TESTPRINZIP:

LIAPHEN Fibrinogen ist ein turbidimetrischer Latex-Immunotest 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 vermischt, bindet in der Probe vorhandenes Fibrinogen an die Antikörper und führt so zur Agglutination. Die Agglutination ist proportional dem Gehalt an Fibrinogen in der Probe und wird durch Lichtabsorption bei 620nm (oder der spezifischen Gerinnungsautomaten-Wellenlänge) gemessen.

Latex + Fibrinogen → Aggregate/Agglutination ($A_{620nm, \dots}$)

IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:

Jede Testpackung enthält:

- **Reagenz (R1), Latex Reagenz:**
4 gebrauchsfertige Flaschen mit je 5 ml Latex Mikropartikel beschichtet mit polyklonalen Kaninchen Anti-Human Fibrinogen Antikörpern. Enthält bovines Serumalbumin (BSA) und Natriumazid (0,9 g/L).

ACHTUNG: Das bovine 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 hochexplosiver Metallazide reagieren. Bei Entsorgung der Lösung in den Abguss muss mit einer großen Menge Wasser nachgespült werden.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

Reagenzien:

- Imidazolpuffer (Art.Nr. AR021A / AR021K / AR021L) oder Tris-NaCl-BSA Puffer pH 7,4 (TBSA, Art.Nr. AR005A / AR005K / AR005L) als Verdünnungspuffer.
- Kalibrator für Fibrinogen (BIOPHEN® Kalibrationsplasma Gerinnung, Art.Nr. 222101)
- Normal und Abnormal Kontrollplasmen für Fibrinogen (BIOPHEN® Kontrollplasma Gerinnung „Normal“, Art.Nr. 223201, BIOPHEN® Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“, Art.Nr. 223301).

Geräte:

- Photometer mit einer Wellenlänge von 620nm, Photometer oder Gerinnungsautomaten für chromogene Tests.
- Stoppuhr
- Kalibrierte Pipetten
- Küvetten oder Mikrotiterplatte

RÜCKFÜHRBARKEIT DES STANDARDS:

Die Konzentration des internen Standards für Fibrinogen wurde mit einem Gerinnungstest (FIBRIPHEN®, Clauss-Methode) gegen den NIBSC Standard SSC/ISTH Lot Nr. 3 bestimmt. Die Messung zeigte keine Abweichungen zwischen 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.

Reagenzstabilität 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 (Gerinnungsautomaten) Angaben zum Testablauf sind zu beachten.

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109M (oder 0,129M) Trinatrium-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. Ikterische, hämolytierte, lipämische Plasmen sind zu verwerfen.

TESTDURCHFÜHRUNG:

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

Kalibration:

Zur Erstellung der Kalibrationskurve kann ein kommerziell verfügbarer Kalibrator (z.B. 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 Tris-NaCl-BSA Puffer. Für diesen Zweck wird der Verdünnungsfaktor (D) wie folgt ermittelt: $D = C:20$. Beispiel: bei einer Fibrinogenkonzentration (C) des Kalibrators von 3.000 µg/ml (3g/L) wird er Verdünnungsfaktor (D) wie folgt ermittelt: $D = 3.000:20 = 150$.

Ausgehend von 3 ml dieser Stammlösung „C1“ mit 20 µg/ml, werden die weiteren Kalibrationspunkte durch Verdünnung mit Tris-NaCl-BSA Puffer wie folgt hergestellt:

Kalibrator	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Fibrinogen (µg/ml)	20	15	10	5	2,5	0
Kalibrator	1000 µL von C1	750 µL von C1	500 µL von C1	250 µL von C1	125 µL von C1	0 µL
Puffer	0 µL	250 µL	500 µL	750 µL	875 µL	1000 µL

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

Plasmaproben oder Kontrollen

Die Plasmaproben und Kontrollplasmen (bis 6 g/L) werden 1:300 mit Puffer 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 (entsprechend 1,5-6g/L) liegt. Beispiel: bei einer Hyperfibrinogenämie (6 bis 20 g/L) muss die Probe 1:1000, bei einer Hypofibrinogenämie (<1g/L) 1:100 verdünnt werden. Bei der Testung von Zellüberständen muss die Konzentration mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt werden. Die verdünnten Proben müssen innerhalb von zwei Stunde getestet werden.

Testprotokoll: Manuelle Methode:

	Küvetten Methode	Mikrotiterplatten Methode
Kalibrator, Kontrollplasma oder Probenplasma (mit Puffer verdünnt)	100 µl	50 µl
Latex Reagenz, vorgewärmt auf 37°C	400 µl	200 µl
Exakt 15 Minuten bei 37°C inkubieren. Anschliessend mischen und die Absorption bei 620nm gegen Puffer messen.		
Die Inkubationszeit muss für alle Proben gleich sein.		

Anmerkung: Bei der manuellen Methode muss bei jedem Testlauf eine Kalibrationskurve erstellt werden. Es können auch andere Wellenlängen (405 bis >700nm) verwendet werden. Je höher die Wellenlänge desto niedriger ist der Leerwert und die Absorption der Plasmaplipide, 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 Pipettierolumina und Verdünnungen abweichen. In jedem Fall müssen jedoch die festgelegten reaktiven Verhältnisse (entsprechende Reagenzkonzentration im Testansatz) 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 BIOPHEN® Kontrollplasma Gerinnung „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.

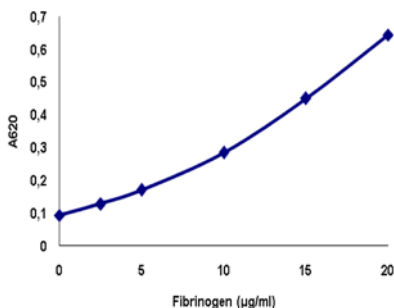
BERECHNUNG DER ERGEBNISSE:

Auf Millimeterpapier wird die Fibrinogen Konzentration (µg/ml) auf der Abszisse (x-Achse) gegen die jeweilige Absorption (A₆₂₀) 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 ≥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 (entsprechend 0,2 g/L in der verdünnten Probe), definiert als die niedrigste Konzentration mit einem VK <20% bei N=15.

Spezifität: in Serum werden Konzentrationen kleiner 0,2 g/L 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 FIBRIIPHEN® (Fibrinogen Gerinnungstest nach Clauss, Art.Nr. CK575K) 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 mit Fibrinogen Fragment D, Fragment DD (D-Dimer) und Fibrinogenabbauprodukten (FDPs) in Plasma oder gereinigten Präparationen. Es gibt keine Kreuzreaktivität mit Fibrin Fragment E.

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

Testeinschränkungen:

Keine Beeinflussung des Test durch Unfraktioniertes Heparin oder Niedermolekulares Heparin ≤2 IE/ml, Bilirubin ≤0,2 g/L, Hämoglobin ≤2 g/L, Intralipid ≤0,75 % (entsprechend 20 g/L Triglyzeride). Die Anwesenheit von Rheumafaktor führt wahrscheinlich zu einer erhöhten Fibrinogenkonzentration. Bei Patienten unter thrombolytischer Therapie muss die Probengewinnung mit einem, dem Antikoagulation zugesetztem Plasmininhibitor (z.B. 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 seinen eigenen Referenzbereich festlegen. Niedrige Fibrinogenkonzentrationen können in folgenden klinischen Situationen beobachtet werden: akutes Leberversagen, angeborene Afibrinogenämie oder Hypofibrinogenämie, disseminierte intravaskuläre Gerinnung, Primärfibrinolyse, Sekundärfibrinolyse, Therapie mit Thrombolytika (Streptokinase, Urokinase, tPA, L-Asparaginase). Erhöhte Fibrinogenkonzentrationen (>5 g/L) in klinischen Situationen werden häufig im Zusammenhang mit Entzündungen beobachtet.

ERGÄNZENDE INFORMATIONEN:

Fibrinogen ist ein Glykoprotein mit 340kD. Es besteht aus 6 Peptidketten, die mit Disulfidbrücken (2 α₂, 2 β₂ 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