

**FIBRIPHEN™**

REF CK571K R 6 x 1 ml

REF CK572K R 6 x 2 ml

REF CK575K R 8 x 5 ml

Koagulační metoda pro kvantitativní měření Fibrinogenu

Datum revize: 10-2021

POUŽITÍ:

FIBRIPHEN™ souprava je určena pro kvantitativní in vitro stanovení Fibrinogenu v lidské citrátové plazmě (Claussova metoda), za použití manuální nebo automatické metody.

SOUHRN:**Technický^{1,2}:**

Fibrinogen je 340 Kd rozpustný glykoprotein, syntetizovaný v játrech. Obsahuje 6 peptidových řetězců, vždy 2 jsou symetrické propojené disulfidickými můstky (2 Aα, 2Bβ a 2γ řetězce). Thrombin štěpí fibrinogen a vytváří fibrin, který je stabilizován aktivovaným FXIII za přítomnosti vápníku. Fibrinogen je štěpen též plazminem – nejdříve na fragmenty X a Y a poté na fragmenty D a E.

Klinický²⁻⁶:

Koncentrace fibrinogenu v normální lidské plazmě je obvykle v rozmezí 2 – 4 g/l. Zvýšené hladiny fibrinogenu (>4 g/l) jsou pozorovány v klinických situacích spojených se zánětem a musí být považovány za rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění a trombózy.

Hypofibrinogenemie je zejména spojena s těžkým onemocněním jater a nadměrnou konzumpcí fibrinogenu (DIC, hyperfibrinolýza). Byly popsány četné varianty fibrinogenu, které nemají buď žádnou symptomatologii, nebo jsou provázeny krvácením či trombozou.

PRINCIP:

V přítomnosti konstantního a nadměrného množství thrombinu je koagulační čas (CT) získaný pro ředěnou citrátovou plazmu závislý na koncentraci fibrinogenu v plazmě.

REAGENCIE:

R Thrombin s kalcium, bovinního původu (okolo 100 NIH/ml), lyofilizovaný v přítomnosti heparin neutralizující látky, konzervancí a stabilizátorů. Obsahuje BSA.

FIBRIPHEN™ 1

REF CK571K - 6 lahviček 1 ml.

FIBRIPHEN™ 2

REF CK572K - 6 lahviček 2 ml.

FIBRIPHEN™ 5

REF CK575K - 8 lahviček 5 ml.

VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ:

- Některé reagenty v soupravě obsahují materiál zvířecího původu. Zacházejte s nimi dle všech platných bezpečnostních opatření pro materiál potencionálně infekční.
- S odpadními produkty by mělo být zacházeno dle lokálních předpisů.
- Používejte pouze reagenty stejné šarže.
- Studie stability prokazují, že reagenty mohou být převáženy za pokojové teploty bez degradace.
- Pouze pro diagnostické použití In Vitro v laboratoři.

PŘÍPRAVA REAGENCIE:

Lahvičku otevírejte opatrně, abyste se vyvarovali ztráty lyofilizátu.

R Rekonstituujte obsah každé lahvičky s přesně:

REF CK571K → 1 ml destilované vody.

REF CK572K → 2 ml destilované vody.

REF CK575K → 5 ml destilované vody.

Dobře promíchejte až do úplného rozpuštění obsahu, zamezte tvorbě pěny. Vložte přímo do analyzátoru dle příslušného aplikačního protokolu.

Pro manuální metodu nechte stabilizovat 30 při pokojové teplotě (18-25°C), homogenizujte před použitím.

SKLADOVACÍ PODMÍNKY A STABILITA:

Neotevřenou reagentii skladujte v originálním balení při 2-8°C. Za těchto podmínek je možné je použít až do data uvedeného na obalu.

R Stabilita reagentie po rozpuštění, pokud je vyloučena kontaminace nebo odpařování, a pokud jsou reagentie skladovány v originální lahvičce, je:

- 14 dní při 2-8°C
- 7 dní při pokojové teplotě 18-25°C
- 1 měsíc při teplotě -20°C nebo nižší*
- Stabilita v analyzátoru: viz specifický aplikační protokol.

*Rozmrzujte pouze jednou co nejdříve při teplotě 37°C a ihned použijte.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ:**Reagencie:**

- Destilovaná voda.
- Imidazolový pufr (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N).
- Specifické kalibrátory a kontroly se známou koncentrací jako např.:

Název produktu	Referenční číslo
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301
EASYPLASMA™ Control Set	225601
EASYPLASMA™ Calibrator	226601

Viz specifický aplikační protokol pro daný analyzátor.

Materiál:

- Elektromagnetická vodní lázeň, poloautomatický nebo automatický analyzátor pro koagulační testy.
- Stopy, kalibrované pipety, plastové zkumavky.

VZOREK:

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109 M citrátového antikoagulantia (1 díl; 0,109M, 3,2%), přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

Vzorky by měly být připraveny a skladovány dle relevantních řádů (pro US viz směrnici CLSI H21-A5⁷ pro odběr vzorku, skladování a zacházení s ním).

Pro skladování plazmy odkazujeme na reference^{7,8}.

POSTUP:

Souprava je určena pro koagulační automatizovanou nebo manuální metodu. Test se provádí při teplotě 37°C a měří se čas koagulace spuštěné přidáním reagentie FIBRIPHEN™.

Pro automatické metody jsou dostupné aplikační protokoly pro použití analyzátor. Viz aplikační protokol a bezpečnostní manuál pro použití stroj.

Pracovní postup:

1. Rekonstituujte kalibrátor a kontroly dle jejich příbalových letáků. Připravte 2 ml kalibrátoru naředěného 1:5 Imidazolovým pufrům (pozn.: dle definice ředění kalibrátoru 1:20 odpovídá koncentraci "C" g/l Fibrinogenu) Pro kalibraci dále ředte kalibrátor Imidazolovým pufrům tak, jak je popsáno v tabulce ("C" definuje koncentraci Fibrinogenu).

Fibrinogen g/l	C:2	C	2C	4C
ředění	1:40	1:20	1:10	1:5
Objem kalibrátoru při 1:5	0,125 ml	0,250 ml	0,500 ml	1 ml
Objem Imidazolového pufru	0,875 ml	0,750 ml	0,500 ml	0 ml

2. Naředte vzorky, kalibrátory a kontroly v Imidazol pufru, viz níže:

Vzorky	Reference	Redění
Kontroly	223201 / 223301 / 225601	1:20
Vzorky	-	1:20

Sestavte kalibrační křivku a testujte kontroly kvality. Pokud uchovávejte při pokojové teplotě (18-25°C), testujte připravené naředěné vzorky rychle. Přesné hodnoty fibrinogenu pro kalibrátor a kontrolní plazmy jsou uvedeny v letáku, přiloženém k těmto plazmám.

Pro zajištění optimálního průběhu testu proveďte všechny testy (kalibrace, kontroly, vzorky) za sebou, bez přerušování.

3. Do reakční kyvety nebo zkumavky, inkubované na 37°C přidejte:

Objem	
Vzorek, kalibrátor nebo kontrola, ředěné 1:20	200 µl
Inkubujte při 37°C po dobu 2 minut přesně. Potom přidejte (a stiskněte stopky)	
R Calcium Trombin předehřátý na 37°C	100 µl
Zaznamenejte přesný čas koagulace (CT, sekundy)	

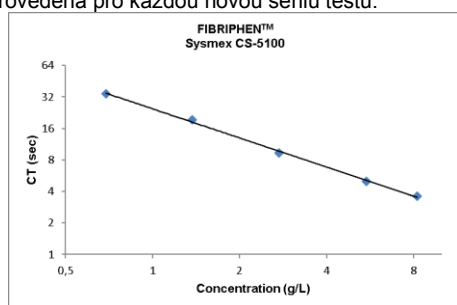
Pokud jsou reakční objemy jiné než uvedené výše, musí být poměr reagensů a vzorku přísně dodržen. Každý uživatel je odpovědný za validaci provedených změn postupu a za jejich vliv na výsledek.

KALIBRACE:

FIBRIPHEN™ může být kalibrován pro testování fibrinogenu. Kalibrátor pokrývající dynamické testovací rozmezí je dostupný od výrobce Hyphen-BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ) a může být použit pro stanovení kalibrační křivky.

- Kalibrační rozmezí je od přibližně 0,7 do 7,5 g/l (na CS-sérii).

Kalibrační křivka uvedená níže je pouze příkladem. Nová kalibrace by měla být provedena pro každou novou sérii testů.



KONTROLA KVALITY:

Použití kontrol slouží k validaci výsledků měření a homogenity metody v sérii nebo mezi sériemi a pro danou šarži reagensie.

Začněte kontroly kvality do každé série měření pro validaci kalibrace. Nová kalibrace by měla být provedena přednostně pro každou sérii testů a nejméně při změně šarže reagensie, po významné údržbě nebo opravě analyzátoru, nebo když jsou výsledky kontrol mimo doporučené rozmezí.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné meze pro svůj analytický systém.

VÝSLEDEK:

- Pro manuální metodu vynesete kalibrační křivku bilogarithmicky (Log-Log) s koagulačním časem (v sekundách) na ose Y a koncentrací Fibrinogenu v g/l na ose X.
- Koncentrace Fibrinogenu (g/l) v testovaném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Pokud jsou použita jiná ředění, musí být výsledek násoben použitým ředícím faktorem.
- Výsledky by měly být interpretovány společně s posouzením klinického stavu pacienta.

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního průběhu testu by měly být dodrženy instrukce výrobce Hyphen-BioMed. Laboratoř musí každou změnu postupu validovat.
- Reagensie neobvyklého vzhledu, nebo jevící známky kontaminace, by měl být vyloučen z používání.
- Vzorky neobvyklého vzhledu nebo vzorky, které mají známky aktivity, by měly být vyloučeny z testování.
- Některé léky mohou ovlivnit výsledky. Proto by měl být neočekávaný nebo abnormální výsledek dále zkoumán ke zjištění příčiny. Diagnóza dysfibrinogenémie musí být vždy potvrzena s antigením testem fibrinogenu. Podání terapeutické koncentrace fibrinogenu se může jevit v testu slabší kvůli bovinnímu trombinu (tedy FIBRIPHEN™) oproti lidskému trombinu⁹.

- Opakování měření stejného vzorku se stejnou šarží reagensie může dávat mírně odlišné časy – dle použitého přístroje a metody detekce koagula, dle jeho nastavení. Proto by měla každá laboratoř stanovit na svoje podmínky obvyklé rozmezí výsledků.
- Pokud je získaný čas koagulace příliš krátký (vysoká koncentrace fibrinogenu) nebo příliš dlouhý (nízká koncentrace fibrinogenu), více nebo méně ředte plazmu.

OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY:

Normální hladina Fibrinogenu v plazmě dospělé populace je obvykle mezi 2 a 4 g/l⁵. Přesto by si měla každá laboratoř stanovit vlastní referenční meze.

CHARAKTERISTIKA:

- Měřicí rozmezí závisí na použitém analytickém systému (okolo 0,4 až 13 g/l Fibrinogenu pro přístroj CS-série, pro vzorek přeředěný)
- Pro lepší přesnost by vzorky s hodnotou ≤ 1 g/l měly být testovány v polovičním ředění (1:10) a získaný výsledek pak dělen 2. Vzorky s hodnotou nad kalibrační rozmezí by pak měla být testovány v ředění dvojnásobném (1:40) a získané výsledky násobeny 2.
- Studie výkonu byly prováděny vnitřně na Sysmex CS-5100. Výkon byl posouzen za použití laboratorních kontrol po dobu 5 dnů, 2 série denně se 3 opakováními v sérii pro danou hladinu kontroly. Byly zjištěny následující hodnoty:

Kontroly	Intra assay				Inter assays			
	N	Průměr	CV%	SD	N	Průměr	CV%	SD
Kontrola 1	40	3.03	1.4	0.04	30	3.04	0.9	0.03
Kontrola 2	40	1.60	1.6	0.03	30	1.55	2.6	0.04

- Korelace s referenční metodou (Dade® Thrombin Reagent vs FIBRINOGEN™ na Sysmex CS-5100):
N = 150
 $y = 1,06x - 0,04$ $r = 0,999$
- **Interference:**
Nebyly zjištěny žádné interference na analyzátoru Sysmex CS-5100 do koncentrací:

Hemoglobin	Bilirubin (F/C)	Heparin (UFH/LMWH)
1000 mg/dl	60 mg/dl	2 U/ml
Rivaroxaban / Apixaban / Edoxaban / Dabigatran		
400 ng/ml		
FDP	Intralipidy	Argatroban
130 µg/ml	1000 mg/dl	400 ng/ml

Viz specifický aplikační protokol pro použitý analyzátor.

REFERENCE:

1. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and function. JTH. 2005.
2. Marguerie G. Le fibrinogène, facteur multifonctionnel de l'hémostase. Medecine/Sciences. 1986.
3. VanDeWater L. et al. Analysis of elevated fibrin(ogen) degradation product levels in patients with liver disease. Blood. 2019.
4. Lowe G.D.O. et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: The Third Glasgow MONICA Survey I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. British Journal of Haematology. 1997.
5. Appel I.M. et al. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012.
6. Ernst E. Plasma fibrinogen – an independent cardiovascular risk factor. Journal of Internal Medicine. 1990.
7. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
8. Woodhams B. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
9. Marchi R. et al. Comparison of different activators of coagulation by turbidity analysis of hereditary dysfibrinogenemia and controls. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2021.

SYMBOLY:

Použité symboly jsou ve shodě s ISO 15223-1 viz dokument Definice symbolů.

|| Změny ve srovnání s předchozí verzí.