



Fibriphen 1

ACK571K

Thrombin reagent for the quantitative clotting assay of Fibrinogen

For *in vitro* diagnostic use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision : 26/02/2008

1. Intended use:

The **Fibriphen 1** kit is a thrombin reagent proposed for the quantitative determination of Fibrinogen in human citrated plasma using a clotting method (Claus method).

2. Assay principle:

In the presence of a constant and in excess amount of thrombin, the clotting time obtained for a diluted citrated plasma depends on the plasma fibrinogen concentration.

3. Assay specimen:

Human plasma obtained from Trisodium Citrate anticoagulated blood.

4. Reagents:

Each kit contains **6 vials of 1 ml** of reagent, containing calcium thrombin from bovine origin (about 100 NIH/ml), lyophilized in presence of an heparin neutralizing substance, preservatives and stabilizers.

Note: Source bovine plasma used for the preparation of the reagent and BSA were tested with registered methods and found negative for infectious diseases, especially for BSE. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of biological origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

5. Reagents and material required, but not supplied:

- Pipettes with dispensing volumes from 20 µl to 1,000 µl.
- Semi-automatic or automatic coagulation instrument, or fibrometer or electromagnetic water bath.
- Distilled water.
- Owren Koller buffer (# AAR003A/AAR003K).
- Reference normal citrated human plasma pool, or plasma calibrator titrated for Fibrinogen (BIOPHEN Plasma Calibrator - # A222101).
- Normal and Abnormal quality control plasmas, titrated for Fibrinogen (BIOPHEN Normal Control Plasma - #A223201 and Plasma Fibrinogen Control Low - #ASC070K).

6. Reagent preparation and stability:

In the original package, and before any use, when stored at 2-8°C, the reagent is stable until the expiration date printed on the kit.

• Reagent Preparation:

Restore each vial with **1 ml** of distilled water; mix gently until complete dissolution of the content (vortex), let to stabilize for about 30 min. at room temperature (18-25°C); homogenize before each use.

• Reagent stability following reconstitution:

- 7 days at room temperature (18-25°C).
- 14 days at 2-8°C.
- 1 month frozen at -20°C or below

In the original vial, provided that any contamination or evaporation is avoided.

7. Sample collection and preparation:

Blood (9 vol.) must be collected on 0.109M (or 0.129M) trisodium citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g. Citrated plasma must be tested within 4 hours when stored at room temperature (18-25°C), or it can be frozen at -20°C or below for up to 1 month. Just before use, the plasma must be thawed for 15 min. in a water bath at 37°C.

Refer to GEHT or NCCLS guidelines for further instructions on specimen collection, handling and storage. Discard any plasma presenting an unusual aspect (haemolysed, lipaemic aspect...).

8. Protocol:

• Calibration curve:

The calibration curve can be established with a normal citrated human plasma pool with a determined Fibrinogen concentration ("C" g/L), or with BIOPHEN Plasma Calibrator (# A222101), using the Fibrinogen concentration (C) indicated on the flyer for the lot used.

Prepare 2 ml of calibrator **diluted 1:5** in Owren Koller buffer (note: by definition, the 1:20 dilution of the calibrator corresponds to a concentration of "C" g/L of Fibrinogen). Using this 1:5 preparation, the calibration curve is obtained as follows:

Fibrinogen (g/L)	C:2	C	2C	4C
Dilution	1:40	1:20	1:10	1:5
Calibrator dil. 1:5	0.125 mL	0.250 mL	0.500 mL	1 mL
Owren Koller Buffer	0.875 mL	0.750 mL	0.500 mL	0mL

The calibration curve must be used within 2 hours at room temperature (18-25°C).

• Preparation of tested plasma, and quality controls:

Tested plasma must be **diluted 1:20** in Owren Koller buffer. The diluted plasma must be tested within 2 hours.

Caution: to ensure optimal performances of the assay, perform all assays (calibration, samples, controls) extemporaneously and successively without interruption.

• Assay:

Mechanical manual method:

Principle: a mechanical coagulation indicator, such as a metal ball or index, or balancing, is used for detecting clotting. The test is performed at 37°C.

Preincubate the reagent at 37°C.

Into a small test tube, or in the reactional cuvette of the coagulation instrument, introduce:

- **200 µL** of calibration solution, or of tested plasma diluted **1:20**.
- Incubate for **2 min. at 37°C**, and then introduce (starting the stop-watch):
- **100 µl of Fibriphen reagent** (preincubated at 37°C).

Record the clotting time CT (in seconds).

D.750.02/CK/571K



6560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Automatic Method:

The assay can be used with the semi-automatic or automatic instruments, such as STA-R, KC-10, etc...

The usual program used for testing Fibrinogen by clotting assay (Claus method) can be applied. The respective specimen and reagent volume ratios indicated for the manual method must be strictly respected. Usually, with automatic methods the volumes used for reagents and diluted tested plasma are half those recommended for the manual method.

With semi automatic or automatic instruments, especially those with a photometric detection of clot formation, obtained clotting times can be slightly different from those obtained with the manual method.

Adaptations on the main coagulation analyzers are available upon request.

9. Expression of results:

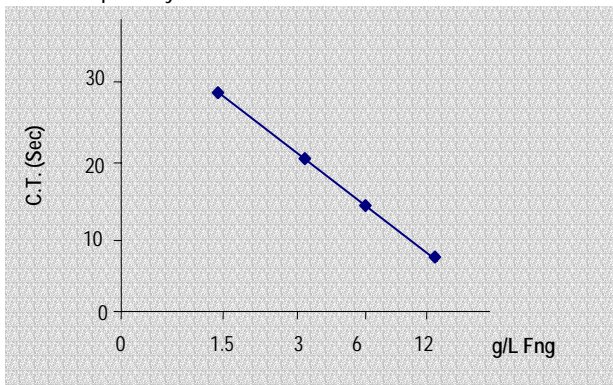
On a bi-logarithmic graph paper, plot on abscissae the Fibrinogen concentrations (in g/L) and on ordinates the corresponding clotting times (in sec).

The Fibrinogen concentration in the tested sample (diluted 1:20) is directly obtained on the calibration curve. Results are expressed in g/L Fibrinogen.

Using automated methods, the Fibrinogen concentrations are directly calculated by the analyser, respectively to the calibration curve, and the sample dilution used.

10. Example of Calibration curve:

This calibration curve, obtained using the manual method, is indicated as an example only.



Only the calibration curve generated for the series of assays performed must be used for calculating the results.

11. Quality Control:

Using quality control plasmas, titrated for Fibrinogen, allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity from run to run, when using a same lot of reagents. Various control plasmas are available:

BIOPHEN Normal Control Plasma: (ref A223201).

Plasma Fibrinogen Control Low (ref ASC070K).

The clotting time obtained for a repeat test and with the same reagent lot can slightly vary according to the instrument used and the clot detection mode and sensitivity adjustment. Each laboratory should establish and validate its own usual range, as well as acceptance ranges, in its specific test conditions.

12. Interferences and limits:

Various drugs or therapies can affect the results (eg: anti-thrombin substances may interfere in the assay and prolong the obtained clotting time). An additional investigation should be conducted to determine the origin of each unexpected or abnormal result.

A "repeat" clotting time for a sample even with the same reagent lot can vary slightly according to the instrument used, and the clot detection mode and instrument setting (clot detection sensitivity). Each laboratory should check and validate its own usual range, as well as target values and acceptance ranges for each new lot of controls, in its specific test conditions.

Any sample presenting an abnormal aspect (eg: lipaemic, haemolysed, partial coagulation...) should be rejected.

The **Fibriphen** reagent contains a heparin neutralizing substance.

There was no significant interference noticed for heparins UFH, LMWH, Arixtra, Hirudin, Argatroban®, Fibrin degradation products (FDP), respectively up to 2 IU/ml, 2 IU/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml, 130 µg/ml added to plasma.

13. Normal values:

Normal values for Fibrinogen are usually in the range 2-4 g/L.

14. General information and Applications:

Fibrinogen is a 340 Kd soluble plasma glycoprotein, synthesized in the liver, containing 6 peptidic chains, with a 2 to 2 symmetry, and linked by disulfide bridges (2 A α , 2 B β and 2 γ chains). Thrombin clots fibrinogen and forms fibrin, which is stabilised by activated factor XIII in presence of calcium. Fibrinogen is lysed by plasmin to fragments X and Y, first, then D and E. (1,3)

Fibrinogen concentration in normal human plasma is usually in the range 2 to 4 g/l. Elevated fibrinogen concentrations (> 4g/l) are observed in clinical situations associated with inflammation (3). Elevated Fibrinogen levels have also been studied as a risk factor for cardiovascular disease and thrombosis (2,3,4)

Hypofibrinogenemia is mainly associated with severe liver disease, and excessive consumption of fibrinogen (DIC, hyperfibrinolysis) (3,4). Numerous variants of fibrinogen have been described, associated to asymptomatic cases, or to cases with bleeding and/or thrombosis (3, 5).

15. Indicative performances and Assay variations:

The indicative clotting times observed for this assay are in the range 4 - 7 seconds, and about 22 \pm 5 seconds, respectively for the 12g/L or 3 g/L Fibrinogen concentrations, using the water bath or STAR method.

Indicative performances obtained in these conditions are as follows:

- Dynamic range: 1-12 g/L (for a sample assayed at the 1:20 dilution)

Note: For a better accuracy, samples measured \leq 1 g/L can be tested at the 1:10 dilution, and obtained results divided by 2; for samples measured >12g/L, the 1:40 dilution can be used and obtained results multiplied by 2.

- Accuracy: as an example, the following results were obtained using the STA-R instrument:

	Fng (g/L)	N	Intra assay CV (%)	Inter assay CV (%)
Sample 1	2.67	10	2.3%	2.3%
Sample 2	1.47	10	2.6%	3.7%

- The Fibriphen reagent shows good correlation with STA-Fib2 reagent (Diagnostics Stago), performed on STA-R instrument:

$$N=58 \quad r^2 = 0.989 \quad Y = 1.02X - 0.16$$

16. References:

- Claus A, Rapid physiological coagulation method for the determination of fibrinogen. Acta Haematol 1957;17:237-46 (German)."
- (1) Completed by : Mosesson MW, Fibrinogen and fibrin structure and function, JTH, 2: 1894-1904, 2005.
- (2) Henschen-Edman AH. On the identification of beneficial and detrimental molecular forms of fibrinogen; 29: 179. Haemostasis 1999-186.
- (3) Lord ST. Fibrinogen. In: Molecular basis of thrombosis and haemostasis. High KA and Roberts HR. ed. Marcel Dekker Inc, 1995: 51-74.
- (4) NCCLS document H30-A2: procedure for the determination of fibrinogen in plasma; Approved guideline - second edition (Vol 21, number 18 (2001).
- (5) www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, +134820, +134850, +134830.

D.750.02/CK/571K



Fibriphen 1 # ACK571K

Détermination quantitative du Fibrinogène par méthode coagulante

A usage diagnostic *in vitro* exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 26/02/2008

1. Utilisation :

Le coffret **Fibriphen 1** est proposé pour la détermination quantitative du Fibrinogène présent dans le plasma humain par méthode coagulante (méthode de Clauss).

2. Principe :

En présence d'une quantité constante et en excès de thrombine, le temps de coagulation d'un plasma dilué dépend de la concentration plasmatique en fibrinogène.

3. Echantillon :

Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté.

4. Réactifs :

Chaque coffret contient **6 flacons de 1 ml** de réactif. Ce réactif contient de la thrombine calcique d'origine bovine (environ 100NIH/ml), lyophilisée en présence d'un inhibiteur spécifique de l'héparine, de conservateurs et de stabilisants.

Nota: Les plasmas bovins utilisés pour la préparation du réactif, ainsi que la BSA, ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts de toute trace de maladie infectieuse, en particulier pour l'encéphalopathie spongiforme bovine. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

5. Matériel nécessaire et non fourni :

- Pipettes à volume fixe ou variable de 20 µl à 1000 µl.
- Appareils de coagulation semi-automatiques ou automatiques, fibromètre ou Bain-Marie électromagnétique le cas échéant.
- Eau distillée.
- Tampon Owren Koller (Réf. AAR003A/AAR003K).
- Pool de plasma normal de référence ou calibrateur titré en Fibrinogène (BIOPHEN Plasma Calibrator - Réf. A222101).
- Plasmas de contrôle de qualité Normal et Anormal titrés en Fibrinogène (BIOPHEN Normal Control Plasma – Réf. A223201 et Plasma Fibrinogen Control Low– Réf. ASC070K).

6. Préparation, conservation et stabilité des réactifs :

Dans l'emballage d'origine, et avant toute utilisation, conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le coffret.

• Préparation du réactif :

Reconstituer le réactif avec **1 ml** d'eau distillée, homogénéiser (vortex) jusqu'à complète dissolution, et laisser stabiliser pendant environ 30 min. à température du laboratoire (18-25°C). Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

• Stabilité du réactif après reconstitution :

- 7 jours à température du laboratoire (18-25°C).
- 14 jours à 2-8°C.
- 1 mois congelé à -20°C ou moins.

dans le flacon d'origine, sous réserve de toute contamination ou évaporation

7. Prélèvement :

Le sang (9 vol.) doit être prélevé sur du citrate trisodique 0.109M (ou 0.129M) (1 vol.); le plasma est obtenu par décantation du surnageant après 20 min. de centrifugation à 2,500 g.

Le plasma citraté doit être utilisé :

- Dans les 4 heures s'il est maintenu à température du laboratoire (18-25°C),
- 1 mois, congelé à -20°C ou moins (avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 min. dans un bain marie à 37°C).

Se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons. Rejeter tout prélèvement suspect (aspect inhabituel, hémolysé, lipémique...).

8. Protocole :

• Gamme d'étalonnage :

La gamme d'étalonnage peut être réalisée avec un pool de plasma normal citraté de concentration « C » connue en Fibrinogène, ou avec le BIOPHEN Plasma Calibrator (Réf. A222101) en utilisant le taux indiqué (C) pour le Fibrinogène du lot utilisé.

Préparer 2 ml de calibrateur **dilué au 1:5** en tampon Owren Koller (note : par définition, la dilution au 1:20 du calibrateur correspond à la concentration « C » g/L de Fibrinogène). Utiliser ce calibrateur dilué au 1:5 pour préparer la gamme d'étalonnage suivante :

Fibrinogène (g/L)	C/2	C	2C	4C
Dilution	1:40	1:20	1:10	1:5
Calibrateur au 1:5	0,125 mL	0,250 mL	0,500 mL	1 mL
Tampon Owren Koller	0,875 mL	0,750 mL	0,500 mL	0 mL

La gamme d'étalonnage ainsi préparée est stable pendant 2 heures à température du laboratoire (18-25°C).

• Plasmas à tester et contrôles :

Diluer le plasma à tester au **1:20** en tampon Owen Koller. Le plasma dilué doit être utilisé dans les 2 heures.

Précaution : dans la mesure du possible, pour obtenir les performances optimales du dosage, tous les essais (gamme, échantillons et contrôles) seront réalisés extemporanément et simultanément.

• Test :

Méthode Manuelle Mécanique :

Principe: Méthode utilisant un indicateur mécanique de coagulation, bille ou index métallique, ou balancement. Le test est réalisé à 37°C.

Préincuber le réactif à 37°C.

Dans un tube à hémolyse, ou une cuvette réactionnelle, introduire:

- **200 µL** de point d'étalonnage, ou de plasma à tester dilué au **1:20**.

Incuber pendant **2 min. à 37°C**, puis introduire (en déclenchant le chronomètre) :

- **100 µl** de réactif Fibriphen (préincubé à 37°C)

Noter le temps de coagulation TC (en secondes).



6560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991 Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

D.750.01/CK/571K

Méthode automatique :

Le test peut être réalisé sur les instruments de coagulation semi-automatiques ou automatiques, comme : STA-R, KC-10, etc...

Le programme habituel utilisé pour doser le Fibrinogène par méthode coagulante (méthode de Clauss), peut être appliqué. Les volumes utilisés peuvent varier selon les instruments. Cependant, le rapport respectif des volumes indiqué pour la méthode manuelle doit être strictement respecté. En règle générale, par méthode automatique les volumes de réactifs utilisés et de prise d'essai sont la moitié de ceux utilisés pour la méthode manuelle. Sur automates (en particulier avec détection optique), les temps de coagulation peuvent varier par rapport à la méthode manuelle.

Différentes adaptations sur les principaux automates du marché sont disponibles sur demande.

9. Expression des résultats :

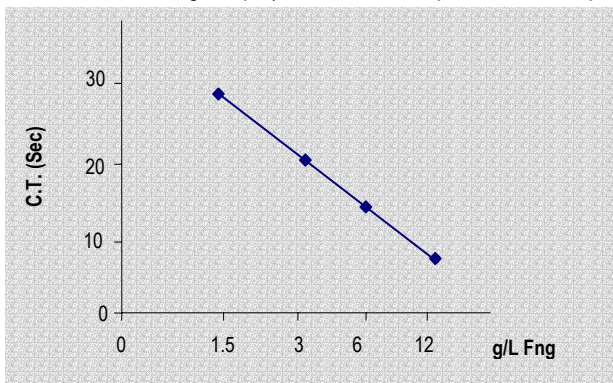
Tracer la droite d'étalonnage sur papier bi-logarithmique, en portant en abscisses les concentrations de Fibrinogène (g/L) et en ordonnées les temps de coagulation correspondants (sec).

La concentration de Fibrinogène dans l'échantillon à doser (dilué au 1/20) est déduite directement de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en g/L de Fibrinogène.

En technique automatique, les taux sont directement calculés par l'instrument en fonction des valeurs de l'étalonnage.

10. Exemple de courbe de calibration :

La courbe d'étalonnage ci-dessous, obtenue avec la méthode manuelle (Bain-Marie électromagnétique), n'est montrée qu'à titre d'exemple.



N'utiliser que la courbe générée pour la série de dosages réalisés.

11. Contrôle Qualité

L'utilisation de plasmas de contrôle, titrés en Fibrinogène, permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs. Différents plasmas de contrôle sont disponibles :

Biophen Normal Control Plasma (réf A223201).

Plasma Fibrinogen Control low (réf ASC070K).

Le temps de coagulation obtenu pour un même échantillon et un même lot de réactif est susceptible de varier légèrement en fonction de l'instrument utilisé et de l'ajustement de la sensibilité de détection du caillot. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir et valider ses propres zones usuelles, et intervalles d'acceptation, dans ses conditions de travail exactes.

12. Interférences et limites:

Les résultats du test peuvent être affectés par des substances ou traitements usuels (ex: présence de substances anti-thrombine, susceptible d'interférer dans le test en allongeant les temps de coagulation). Une investigation complémentaire devra donc être réalisée afin de déterminer l'origine de tout résultat anormal ou inattendu.

Le temps de coagulation obtenu pour un même échantillon et un même lot de réactifs est susceptible de varier légèrement en fonction de l'instrument utilisé, du mode de détection et de l'ajustement de la sensibilité de détection du caillot. Il est donc recommandé à chaque laboratoire de vérifier et valider ses propres zones usuelles, ainsi que les valeurs cibles et intervalles de confiance pour chaque nouveau lot de contrôle de qualité utilisé, dans ses conditions spécifiques de test.

Tout prélèvement présentant un aspect anormal (lipémique, hémolysé, coagulation partielle...) devra être rejeté.

Le réactif **Fibriphen** contient un inhibiteur de l'héparine. Aucune interférence significative n'a été observée pour les héparines HNF, HBPM, Arixtra, Hirudine, Argatroban®, Produits de dégradation de la Fibrine (PDF), pour des concentrations respectives de 2 UI/ml, 2 UI/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml, 130 µg/ml ajoutées dans le plasma.

13. Valeurs usuelles

Les valeurs normales du Fibrinogène sont habituellement de 2 à 4 g/L.

14. Rappels et Applications :

Le Fibrinogène est une glycoprotéine plasmatique soluble de 340 Kd synthétisée dans le foie, composée de 6 chaînes symétriques 2 à 2, et reliées par des ponts disulfures ($A\alpha$, $B\beta$ et γ). Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène est coagulé en fibrine. La plasmine le dégrade en fragments X et Y d'abord, puis en fragments D et E (1,3).

Les valeurs normales du Fibrinogène sont habituellement de 2 à 4 g/L. Des taux élevés de Fibrinogène (> 4g/l) sont observés dans divers contextes cliniques associés à un état inflammatoire (3), et ont également été étudiés comme facteur de risque de pathologie cardiovasculaire ou thrombotique (2,3,4).

L'hypofibrinogénémie est principalement associée à des contextes de pathologie hépatique sévère, et de consommation excessive du fibrinogène (CIVD, hyperfibrinolyse)(3,4).

Des variants fibrinogène ont été décrits, et associés à des cas asymptomatiques, ou à des cas de saignement et/ou thrombose (3, 5).

15. Performances et Variations :

Les temps de coagulation indicatifs obtenus sont de l'ordre de 4 à 7 secondes, et environ 22 ± 5 secondes, pour les concentrations respectives de 12g/L ou 3 g/L de Fibrinogène, au bain marie et STAR.

Performances indicatives obtenues dans ces conditions:

- Zone de mesure : 1-12 g/L (pour un échantillon testé au 1 :20)

Note : Pour une meilleure précision des résultats, pour un échantillon mesuré ≤ 1 g/L, utiliser la dilution 1:10 et diviser le taux ainsi obtenu par 2 ; pour un échantillon mesuré > 12 g/L, utiliser la dilution 1:40 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2.

- Précision: à titre d'exemple, les résultats suivants ont été obtenus sur STA-R:

	Fng (g/L)	N	CV intra essai (%)	CV inter essais (%)
Echantillon 1	2.67	10	2.3%	2.3%
Echantillon 2	1.47	10	2.6%	3.7%

- Les performances du réactif Fibriphen sont bien corrélées avec celles du réactif STA-Fib2 (Diagnostica Stago) sur STA-R :
 $N = 58$ $r^2 = 0.989$ $Y = 1.02X - 0.16$

16. References :

- Clauss A, Rapid physiological coagulation method for the determination of fibrinogen. Acta Haematol 1957;17:237-46 (German)."
- (1) Completed by : Mosesson MW, Fibrinogen and fibrin structure and function, JTH, 2: 1894-1904, 2005.
- (2) Henschen-Edman AH. On the identification of beneficial and detrimental molecular forms of fibrinogen; 29: 179. Haemostasis 1999-186.
- (3) Lord ST. Fibrinogen. In: Molecular basis of thrombosis and haemostasis. High KA and Roberts HR. ed. Marcel Dekker Inc, 1995: 51-74.
- (4) NCCLS document H30-A2: procedure for the determination of fibrinogen in plasma; Approved guideline - second edition (Vol 21, number 18 (2001)).
- (5) www.ncbi.nlm.nih.gov, OMIM, +134820, +134850, +134830.