

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL FIBRINOGENO – METODO DI CLAUSS

REF CO1060 6x2 mL + 2x40 mL

Uso Diagnostico In Vitro

PRINCIPIO

Il Fibrinogeno (Fattore I della coagulazione) è una glicoproteina di peso molecolare di circa 340 kD, presente nel plasma in un range di concentrazione di 200 – 400 mg/dL (2-4 g/L). La sua presenza ed il suo buon funzionamento è di vitale importanza per il buon esito del processo coagulativo (emostasi). La Trombina rompe il Fibrinogeno in monomeri di fibrina che si aggregano in filamenti per formare un coagulo, poi stabilizzato dal Fattore XIII. Il metodo di Clauss utilizza un eccesso di Trombina per formare rapidamente Fibrina a partire dal Fibrinogeno del campione. Il tempo di formazione del coagulo è inversamente proporzionale alla concentrazione di Fibrinogeno. Utilizzando un calibratore a concentrazione nota di Fibrinogeno è possibile costruire una curva di calibrazione su cui riportare i tempi dei campioni per ottenere le corrispondenti concentrazioni.

SIGNIFICATO CLINICO

L'aumento dei valori di Fibrinogeno è associato a un rialzo del rischio cardiovascolare. Più Fibrinogeno in circolo significa infatti una maggiore tendenza del sangue a coagulare, e viceversa.

Il dosaggio del Fibrinogeno è utile quando si verificano episodi di sanguinamento (difetto di Fibrinogeno) o trombotici (eccesso di Fibrinogeno), quando il tempo di protrombina (PT) e/o il tempo parziale di tromboplastina (PTT) sono allungati, quando il paziente ha parenti con un'anomalia o una carenza ereditaria di Fibrinogeno, quando sono necessarie informazioni per valutare il rischio del paziente di sviluppare una patologia cardiovascolare.

Valori cronicamente elevati di Fibrinogeno sono associati a un maggior rischio cardiovascolare (aumentata suscettibilità a malattie come trombosi, ictus, malattie coronariche, angina pectoris e infarto).

I suoi livelli, insieme alle cosiddette proteine di fase acuta (proteina C reattiva, fattori del complemento, protrombina ecc.), aumentano durante processi infiammatori di qualsiasi origine, nel post operatorio e durante la gravidanza.

Altre possibili cause di incremento della concentrazione di Fibrinogeno comprendono infezioni acute, tumori, malattie cardiovascolari, infarto del miocardio e patologie delle arterie periferiche, ictus epatite, malattie infiammatorie (come l'artrite reumatoide e la glomerulonefrite) gravi ustioni, traumi e/o ferite, uso di contraccettivi orali (pillola anticoncezionale), tabagismo, obesità.

Una riduzione dei valori di Fibrinogeno si osserva in caso di gravi epatopatie (per ridotta capacità di sintesi epatica), di CID (Coagulazione Intravascolare Disseminata, per l'eccessivo consumo dovuto alla presenza di numerosi trombi), di afibrinogenemia, disfibrinogenemia o ipofibrinogenemia (deficit ereditari che provocano diminuita produzione di Fibrinogeno), di malnutrizione grave, di anemia, di embolia, di emofilia, di fibrinolisi, di infezioni molto gravi, di malattie del fegato, di eclampsia, di alcune forme tumorali come leucemia e carcinoma della prostata, di trasfusioni rapide di grosse quantità di sangue.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Fib-Reagent: Alfa-Trombina umana altamente purificata, in soluzione calcica tamponata.

Imidazol: Soluzione tamponata di Imidazolo.

PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Fib-Reagent: Liofilo. Prima della ricostituzione, se conservato a 2-8° C, è stabile fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Ricostituire con 2 mL di acqua distillata. Tenere il reagente così ricostituito a 18-25° C prima di adoperarlo, agitando delicatamente di tanto in tanto, evitando che il

liquido tocchi il tappo. Stabilità dopo ricostituzione: 3 giorni a 22° C, 7 giorni a 17° C e 7 giorni a 2-8° C. Evitare il congelamento.

Imidazol: Liquido e pronto all'uso. Se conservato a 2-8° C è stabile fino alla data di scadenza riportata in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riportarli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come mancato recupero dei valori di plasmici di controllo certificati.

CAMPIONI

Plasma fresco e decalcificato. Prelevare da vena 9 parti di sangue intero e miscelare con 1 parte di citrato trisodico (3,2% - 109 mmol/L). Non è raccomandato il citrato trisodico 3,8% - 129 mmol/L).

Miscelare delicatamente, centrifugare (1500 x g per 15 minuti) prima di eseguire il test (entro le 2 ore dal prelievo) sul plasma sovranatante.

Per ulteriori dettagli sulla modalità di prelievo, riferirsi al documento NCCLS H3-A3 e H21-A3.

PROCEDURA

Per uso in automazione, fare riferimento al manuale d'uso dello strumento.

Per uso sui sistemi semiautomatici o in manuale, procedere come segue (è sempre consigliabile eseguire le determinazioni in duplicato).

1. Portare a 37° C un volume di Reagent (Trombina) sufficiente per l'esecuzione dei test programmati.
2. Preparare una diluizione 1:10 in Imidazol (tamponi) dei campioni in esame o dei controlli (p.es. 100 µL + 900 µL). Per il calibratore effettuare le diluizioni descritte nel paragrafo CALIBRAZIONE.
3. Aggiungere ad ogni cuvetta di reazione 200 µL di plasma di controllo, di calibrazione o del paziente in esame, diluiti come descritto sopra.
4. Incubare le cuvette di reazione per almeno 2 minuti a 37° C.
5. Portare in cella di lettura la cuvetta di reazione, azzerare il cronometro, aggiungere 100 µL di Fib-Reagent (Trombina) e contemporaneamente far partire il cronometro.
6. Misurare il tempo di coagulazione.

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Allestire una curva di calibrazione con il calibratore non fornito e disponibile a parte:

MTD PLASMA CAL 14x1 mL REF: CO1120

Ricostituire il calibratore con acqua distillata, preparare le seguenti diluizioni in Tampone Imidazol:

Diluizione	Concentrazione Corrispondente
1:5	N x 2
1:10	N x 1
1:20	N x 0,5
1:40	N x 0,25

N = concentrazione del calibratore di Fibrinogeno.

Di ogni diluizione eseguire il test in duplicato, fare la media dei tempi ottenuti per ogni diluizione, riportare in un grafico la curva Concentrazione/Tempi.

Se lo strumento adoperato lo consente, è possibile immettere nel suo software i valori della curva per una gestione automatica del calcolo.

CALCOLO

Riportare sulla curva di calibrazione ottenuta sperimentalmente i tempi dei campioni e ottenere le concentrazioni corrispondenti.

Fattore di Conversione: mg/dL x 0,01 = g/L ; g/Lx100 = mg/dL

CONTROLLO DI QUALITA'

Per il Controllo di Qualità Interno (verifica della Precisione), adoperare Plasmi di Controllo a livello normale (I) e patologico (II):

MTD PLASMA CONT I-II 7+7 x 1 mL REF: CO1110

Per il Controllo di Qualità Esterno (VEQ) (verifica dell'Accuratezza), ogni laboratorio dovrebbe aderire ad un programma presso un Ente terzo certificato.

VALORI ATTESI

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati. I valori normali dipendono dalla popolazione dell'area in cui si opera e dalla strumentazione adoperata.

Solo come linea guida, si possono considerare normali:

200 – 400 mg/dL (2 – 4 g/L)

In caso di valori inferiori a 100 mg/dL (1 g/L) è consigliabile ripetere il test diluendo il campione 1:5 al posto di 1:10 e dividendo il risultato ottenuto per 2.

INTERFERENZA E SPECIFICITA'

- Ossalato di sodio, EDTA ed Eparina non sono anticoagulanti utilizzabili.
- Trigliceridi > 700 mg/dL, Bilirubina > 15 mg/dL, Emoglobina > 0,68 g/dL possono interferire
- Il prodotto è stato studiato per funzionare a 37° C ±0,5° C. Assicurarsi che tutti gli elementi riscaldanti, pertanto, si trovino costantemente a tale temperatura.
- Non ritardare a mescolare il sangue con l'anticoagulante in sede di prelievo. Evitare la schiuma nei campioni.
- Il congelamento e lo scongelamento del plasma possono compromettere i risultati
- Reazioni infiammatorie acute potrebbero aumentare il valore di fibrinogeno

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

La precisione dipende da molti fattori quali lo strumento, la tecnica usata, il reagente. E' stato eseguito uno studio sulla precisione con una serie di 20 campioni normali e 20 patologici ed è stato valutato il CV% della serie:

Livello Normale: Campioni= 20; CV = 1,5%

Livello Patologico: Campioni= 20; CV = 1,3%

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE)

Il confronto tra questo Metodo (x) ed un altro prodotto del commercio (y), utilizzando plasmi di controllo a varie concentrazioni (valori bassi, normali, alti) ha dato i seguenti risultati:

N. Test	Campione	Media MTD	Media Altro Reagente
10	Basso	149 mg/dL	158 mg/dL
10	Normale	298 mg/dL	291 mg/dL
10	Alto	475 mg/dL	489 mg/dL

$$y=0,83x + 0,09 \quad r=0,99$$

PRECAUZIONI

Il **Reagent** non contiene sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le sue concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT).

Il prodotto è etichettato secondo le direttive CE. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Il **Tampone Imidazolo** può causare effetti irreversibili se ingerito e può provocare danno agli organi:

R 23/24(H331 – H311) Tossico per inalazione e contatto con la pelle.

R 68-22 (H371) Possibilità di effetti irreversibili per ingestione. Può provocare danno agli organi.

In osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè si maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali, applicando la legislazione vigente.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA COMPLETA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

- Clauss A: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol; 17:237; 1957.
2. Koepke JA, Gilmer PR, Filip DJ, Eckstein JD, Sibley CA: Studies of fibrinogen measurement in the CAP survey program. Am J Clin Pathol; 63:984; 1975.