

**FIBRIPHEN™**

REF	CK571K	R	6 x 1 mL
REF	CK572K	R	6 x 2 mL
REF	CK575K	R	8 x 5 mL

Méthode coagulante pour la détermination quantitative du Fibrinogène.

Français, dernière révision : 10-2021

UTILISATION:

Le coffret FIBRIPHEN™ est une méthode coagulante pour la détermination quantitative *in vitro* du Fibrinogène présent dans le plasma humain citraté (méthode de Clauss), en utilisant une méthode automatisée ou manuelle.

RESUME ET EXPLICATION:**TECHNIQUE** ^{1,2}

Le Fibrinogène est une glycoprotéine plasmatique soluble de 340 Kd synthétisée dans le foie, composée de 6 chaînes peptidiques, symétriques 2 à 2, et reliées par des ponts disulfures (2 chaînes A α , 2 B β et 2 γ). Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène est coagulé en fibrine, ensuite stabilisée par le Facteur XIII activé, en présence de calcium. La plasmine le dégrade en fragments X et Y d'abord, puis en fragments D et E.

Clinique ²⁻⁶

La concentration de Fibrinogène en plasma humain normal est 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, et sont également considérés comme facteur de risque de pathologie cardiovasculaire ou thrombotique.

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

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

PRINCIPE:

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

REACTIFS:

R **Thrombine Calcique** d'origine bovine (environ 100 NIH/mL), contient de la BSA, un inhibiteur spécifique de l'héparine et des stabilisants.

FIBRIPHEN™ 1

REF CK571K → 6 flacons de 1 mL.

FIBRIPHEN™ 2

REF CK572K → 6 flacons de 2 mL.

FIBRIPHEN™ 5

REF CK575K → 8 flacons de 5 mL.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine animale. Ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.

R Reconstituer chaque flacon avec exactement :

REF CK571K → 1 mL d'eau distillée.

REF CK572K → 2 mL d'eau distillée.

REF CK575K → 5 mL d'eau distillée.

Agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète, en évitant la formation de mousse et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- **14 jours** à 2-8°C.
- **7 jours** à température ambiante (18-25°C).
- **1 mois** congelé à -20°C ou moins*
- **Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C et utiliser immédiatement.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:**Réactifs:**

- Eau distillée.
- Tampon Imidazole (AR021B/AR021K/AR021L/AR021M/AR021N).
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301
EASYPLASMA™ Control Set	225601
EASYPLASMA™ Calibrator	226601

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Bain-Marie électromagnétique, automate de coagulation semi-automatique ou automatique.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁷ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

Pour la conservation des plasmas, se référer aux références^{7,8}.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode manuelle ou automatisée. Le test est réalisé à 37°C, et le temps de coagulation, déclenché par l'ajout du réactif FIBRIPHEN™, est mesuré.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Préparer 2 mL d'étalon dilué au 1/5 en tampon Imidazole (note : par définition, la dilution au 1/20 de l'étalon correspond à la concentration « C » g/L de Fibrinogène). L'étalon doit être dilué dans du tampon Imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration (« C » définit la concentration en Fibrinogène) :

Fibrinogène (g/L)	C/2	C	2C	4C
Dilution	1/40	1/20	1/10	1/5
Volume étalon au 1/5	0,125mL	0,250mL	0,500mL	1mL
Volume Tampon Imidazole	0,875mL	0,750mL	0,500mL	0mL

2. Diluer les échantillons et contrôles dans du tampon Imidazole comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Références	Dilution
Contrôles	223201 / 223301 / 225601	1/20
Echantillons à tester	NA	1/20

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le kit.

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

3. Introduire dans une cuvette, un tube pour tests en plastique incubé à 37°C :

Volume	
Etalons, échantillons ou contrôles dilués	
200µL	
Incuber à 37°C, pendant 2 minutes puis introduire (en déclenchant le chronomètre) :	
R	Thrombine Calcique préincubée à 37°C
	100 µL
Noter le temps de coagulation TC (en secondes) exact.	

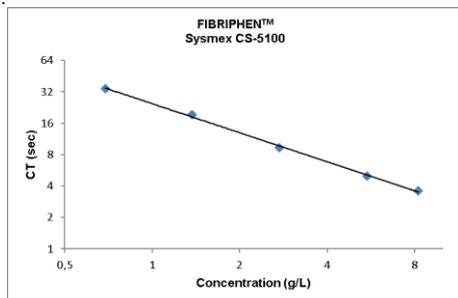
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION:

Le test FIBRIPHEN™ peut être calibré pour le dosage coagulant du fibrinogène. L'étalon couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 0,7 à 7,5 g/L (sur CS-series).

La courbe de calibration ci-dessous, est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, tracer la droite de calibration log-log, en portant en ordonnées le temps de coagulation (sec) et en abscisses la concentration de Fibrinogène en g/L.
- La concentration de Fibrinogène (g/L) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu doit être multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Différents médicaments ou traitements peuvent affecter les résultats. Une investigation complémentaire devra être réalisée afin de déterminer l'origine de tout résultat anormal ou inattendu. Le diagnostic de dysfibrinogénémie doit toujours être combiné avec un dosage antigénique du fibrinogène. Le recouvrement des concentrés thérapeutiques de fibrinogène peut également être impacté par le type de réactif utilisé, et paraître plus faible avec la thrombine bovine (telle que FIBRIPHEN™) comparativement à la thrombine humaine⁹.
- Le TC obtenu pour un même échantillon et un même lot de réactifs est susceptible de varier en fonction de l'instrument utilisé et du mode de détection du caillot.
- Si le TC obtenu est trop court (forte concentration en fibrinogène), diluer davantage le plasma. Si le TC obtenu est trop long (faible concentration en Fibrinogène), moins diluer le plasma.

VALEURS ATTENDUES:

La valeur normale en Fibrinogène d'un plasma adulte est généralement comprise entre 2 et 4 g/L⁵. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES:

- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 0,4 à 13 g/L de fibrinogène sur CS-series, avec redilution).
- Pour une meilleure précision des résultats, pour un échantillon mesuré ≤ 1 g/L, utiliser une dilution deux fois moindre et diviser le taux ainsi obtenu par 2 ; pour un échantillon élevé (supérieur à la calibration), utiliser une dilution supplémentaire par 2 et multiplier le taux ainsi obtenu par 2.
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 3 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	N	Moy.	CV%	SD	n	Moy.	CV%	SD
Contrôle 1	40	3,03	1,4	0,04	30	3,04	0,9	0,03
Contrôle 2	40	1,60	1,6	0,03	30	1,55	2,6	0,04

- Corrélation avec une autre méthode (Dade® Thrombin Reagent vs FIBRIPHEN™ sur Sysmex CS-5100) :
 $n = 150$ $y = 1,06x - 0,04$ $r = 0,999$

Interférences :

Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Hémoglobine	Bilirubine (F/C)	Héparines (HNF/HBPM)
1000 mg/dL	60 mg/dL	2 UI/mL
Rivaroxaban / Apixaban / Edoxaban / Dabigatran		
400 ng/mL		
PDF		
Intralipides		
Argatroban		
130 µg/mL	1000 mg/dL	400 ng/mL

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

- Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and function. JTH. 2005.
- Marguerie G. Le fibrinogène, facteur multifonctionnel de l'hémostase. Médecine/Sciences. 1986.
- VanDeWater L. *et al.* Analysis of elevated fibrin(ogen) degradation product levels in patients with liver disease. Blood. 2019.
- 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.
- Appel I.M. *et al.* Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012.
- Ernst E. Plasma fibrinogen – an independent cardiovascular risk factor. Journal of Internal Medicine. 1990.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008
- Woodhams B. *et al.* Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.
- Marchi R. *et al.* Comparison of different activators of coagulation by turbidity analysis of hereditary dysfibrinogenemia and controls. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2021.

SYMBLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changements par rapport à la précédente version.