Heamostica

بروشور فیبرینوژن

REF	SA09	شماره بروشور

لطفا قبل از انجام آزمایش، اطلاعات موجود در برگه راهنمای انجام آزمایش را به دقت بخوانید.

موارد استفاده: تعیین کمی سطح فیبرینوژن در پلاسما با روش لخته شدن Clauss (۱).

مقدمه

فیبرینوژن یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی تقریباً ۳۴۰۰۰۰ دالتون است که در پلاسما غلظتی در محدوده ۲ تا ۴ گرم در لیتر (۴۰۰-۲۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) دارد (۲). فیبرینوژن در کبد (به میزان ۱/۷ تا ۵ گرم در روز) و نیز توسط مگاکاریوسیت ها سنتز می شود(۳،۴). به دلیل وجود پلی مورفیسم ژنتیکی برای این ژن، سطح فیبرینوژن پلاسما در افراد مختلف، متفاوت است (۵). نیمه عمر فیبرینوژن حدود ۳-۵ روز است (۴). ترومبین (فاکتور IIa) با اثر بر روی مولکول فیبرینوژن، آن را می شکند تا ۲ قطعه فیبرینوپپتید A (FPA) از زخیره های Aα و ۲ قطعه فیبرینوپپتید B (FPB) از زخیره های Bβ را جدا کند (۵). مونومر های فیبرین که از این واکنش ها تولید می شوند، برای تشکیل شبکه ی فیبرین تجمع می یابند و متعاقباً توسط فاکتور XIIIa پایدار می شوند. مرحله اول این تثبیت شامل اتصال دو زخیره γ از دو مونومر فیبرین است که موجب تولید D-dimer در زمان تخریب فیبرین می گردد (۶).

افزایش سطح فیبرینوژن در دیابت، سندرم های التهابی و نیز چاقی مشاهده می شود (۷). کاهش سطح فیبرینوژن در DIC و فیبرینولیز مشاهده می شود .به نظر می رسد فیبرینوژن در بیماری زایی عوارض قلبی عروقی ترومبوتیک دخیل باشد (۷، ۸).

اصول آزمایش

اساس این تست اضافه کردن ترومبین به پلاسما جهت ایجاد لخته است. در حضور میزان بالای ترومبین، زمان لخته شدن پلاسمای رقیق شده، ارتباط مستقیمی با سطح فیبرینوژن پلاسما دارد (۲، ۳).

در صورتی که ترومبین با غلظت بالا استفاده شود زمان تشکیل لخته در پلاسمای رقیق شده، نسبت مستقیم با غلظت فیبرینوژن پلاسما دارد. در این آزمایش، ترومبین با غلظت فراوان به پلاسمای رقیق اضافه می‌شود و زمان لازم برای تشکیل لخته ثبت می‌گردد.

احتیاط

- لطفا تمام اطلاعات بروشور را قبل از انجام تست بخوانید.
- کیت در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود. این معرف ها فقط باید توسط پرسنل آزمایشگاه پزشکی استفاده شوند. قبل از استفاده، از روش کار دستگاه کاملا آگاهی داشته باشید.
- در برخورد با این معرف ها و نمونه های بیمار دقت زیادی به خرج دهید. دفع مواد زائد باید مطابق مقررات محلی انجام شود.
- تمام نمونه ها باید خطرناک در نظر گرفته شوند و با آن ها مثل عامل عفونی رفتار شود.
- در صورت مشاهده آلودگی میکروبی و یا تشکیل رسوب استفاده نشود. آلودگی بیولوژیکی تجهیزات توزیع کننده، ظروف یا معرف ها می تواند منجر به نتایج نادرست شود.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

- خونگیری برای تست های انعقادی باید در لوله های حاوی ضد انعقاد سیترات سدیم ۳|۲ ٪ انجام شود. نسبت خون به ضد انعقاد باید ۹ به ۱ باشد.
  توجه: از پلاسمای دارای ضد انعقاد هپارین، و اگزالات استفاده نشود.
- پلاسمای مورد استفاده، پلاسمای فقیر از پلاکت (PPP) است که برای تهیه ی آن باید خون به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۲۰۰۰تا ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شود . تعداد پلاکت ها باید کمتر از ۱۰۰۰۰ در میکرولیتر باشد.
- پلاسما به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق، ۲۴ ساعت در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد و دو هفته در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قابل نگه داری است.
- نمونه هایی که کمتر از ۹۰ درصد حجم مورد انتظار پر شده اند باید رد شوند.
- مخلوط کردن خون با ضد انعقاد را به تأخیر نیندازید.
- نمونه های کدر، ایکتریک ، لیپمیک یا همولیز ممکن است منجر به تداخل در تست ها شوند.
- فریز و ذوب پلاسمای حاوی سلول های باقیمانده باعث ایجاد غشای سلولی آسیب دیده می شود و نتایج را تحت تأثیر قرار می دهد.

نگه داری و آماده سازی محلول ها:

به هر ویال میزان ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید. معرف آب شده را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید. سپس به آرامی معرف آب شده را هم بزنید.

توجه: برای جلوگیری از آلودگی میکروبی یا شیمیایی که ممکن است پایداری معرف را کاهش دهد، معرفها باید فقط در زمان انجام آزمایش از یخچال (۲ تا ۸ درجه سانتیگراد) خارج و باز باشند.

معرف ها تا پایان تاریخ انقضای خود در دمای ۲ تا ۸ درجه پایدار هستند.

کیت پس از آب شدن در صورت نگه داری در دمای ۲ تا ۸ درجه تا ۱۸ روز قابل استفاده است. پس از خروج معرف آب شده از یخچال، معرف را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داری کنید و سپس تست ها را انجام دهید.

مواد و تجهیزاتی که مورد نیاز هستند ولی در کیت موجود نیستند:

- دستگاه کواگولومتر در روش اتوماتیک و نیمه اتوماتیک و بن ماری در روش دستی
- سمپلر برای روش دستی و نیمه اتوماتیک
- دستکش و نوک سمپلر
- کورنومتر در روش دستی
- آب مقطر
- بافر ایمیدازول یا اورن کولر
- پلاسمای کالیبراتور
- پلاسمای کنترل

روش انجام آزمایش:

- این تست به صورت دستی یا توسط سیستم های انعقادی نیمه اتوماتیک قابل انجام می باشد. در روش دستی و نیمه اتومات پلاسمای بیماران باید به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر ایمیدازول رقیق گردد.
- **روش دستی:**
- ۱. نمونه ها را به نسبت ۱:۱۰ (۰\۱ میلی لیتر نمونه + ۹\. میلی لیتر بافر) رقیق کنید.
- ۲. آزمایش را در لوله های شیشه ای کاملاً تمیز انجام دهید.
- ۳. دمای بن ماری باید ۳۶ تا ۳۸ درجه سانتیگراد باشد.
- ۴. ۲\. میلی لیتر از نمونه رقیق شده را به مدت ۲ تا ۳ دقیقه انکوبه کنید.
- ۵. ۱\. میلی لیتر معرف را به نمونه اضافه کنید و همزمان تایمر را شروع کنید.
- ۶. لوله را بصورت متوالی کج کنید و در لحظه ای که تشکیل لخته از حرکت مایع جلوگیری کرد فورا تایمر را متوقف کرده و زمان را ثبت کنید.
- ۷. غلظت فیبرینوژن را با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه کنید.
- **روش نیمه اتوماتیک:**
- ۱. نمونه ها را به نسبت ۱:۱۰ (۱\. میلی لیتر نمونه + ۹\. میلی لیتر بافر) رقیق کنید.
- ۱۲\. میلی لیتر از نمونه رقیق شده را به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه کنید.
- ۳. ۱\. میلی لیتر معرف را به نمونه اضافه کنید و همزمان تایمر را شروع کنید.
- ۴. زمان تشکیل انعقاد را یادداشت کنید.
- ۵. غلظت فیبرینوژن را با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه کنید.
- محدوده نرمال مربوط به هر آزمایشگاه و در هر سری از آزمایش می باشد که برای معرف و دستگاه های مختلف مشخص می شود. این معیار بر اساس میانگین Fibrinogen Time مربوط به ۶ نفر یا تعداد بیش تری از افراد دارای Fibrinogen Time نرمال بدست می آید.
- **رسم منحنی کالیبراسیون:**
- رقت های پلاسمای مرجع را مطابق جدول زیر از پلاسمای کالیبراتور (ترجیحا STA®- Unicalibrator) تهیه کنید:

Dilution Factor	Buffer (mL)	calibrator	
		Volume (ml)	Dilution
۱۰/۵=۲	۰|۴	۰|۱	۱:۵
۱۰/۱۰=۱	۰|۹	۰|۱	۱:۱۰
۱۰/۱۵=۰|۶۷	۱|۴	۰|۱	۱:۱۵
۱۰/۲۰=۰|۵	۱|۹	۰|۱	۱:۲۰
۱۰/۳۰=۰|۳۳	۲|۹	۰|۱	۱:۳۰

رقت ۱:۱۰ پلاسمای مرجع نشان دهنده ۱۰۰٪ غلظت تخمینی فیبرینوژن است.

فاکتورهای رقت نشان داده شده در جدول بالا نشان دهنده رابطه بین رقت 1:10 پلاسمای مرجع و سایر رقت ها است.

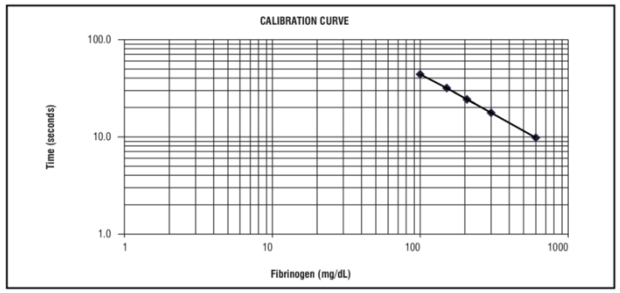
زمان انعقاد را برای هر رقت از پلاسمای مرجع با یک رقم اعشار (۰/۱ ثانیه) اندازه گیری کنید.

منحنی کالیبراسیون را با استفاده از کاغذ لگاریتمی رسم کرده، به صورتی که مقادیر غلظت را در محور X و زمان انعقاد را در محور Y قرار دهید.

برای به دست آوردن مقادیر فیبرینوژن نمونه های بیمار و کنترل، نتایج را مستقیماً از منحنی بخوانید.

به عنوان مثال: غلظت فیبرینوژن در STA®—Unicalibrator: ۳۰۴ میلی گرم در دسی لیتر:

STA®—Unicalibrator		Buffer (mL)	Dilution Factor	Fibrinogen (mg/dL)	Time (sec)
Dilution	Volume (ml)				
۱:۵	۰.۱	۰.۴	۱۰/۵=۲	۳۰۴ x ۲ = ۶۰۸	۱۰
۱:۱۰	۰.۱	۰.۹	۱۰/۱۰=۱	۳۰۴ x ۱ = ۳۰۴	۱۸
۱:۱۵	۰.۱	۱.۴	۱۰/۱۵=۰.۶۷	۳۰۴ x ۰.۶۷ = ۲۰۴	۲۵
۱:۲۰	۰.۱	۱.۹	۱۰/۲۰=۰.۵	۳۰۴ x ۰.۵۰ = ۱۵۲	۳۲
۱:۳۰	۰.۱	۲.۹	۱۰/۳۰=۰.۳۳	۳۰۴ x ۰.۳۳ = ۱۰۰	۴۴.۸



انجام تست برای نمونه ی بیماران

با استفاده از کیت، تست فیبرینوژن برای بیماران انجام شده و زمان به دست آمده بر روی نمودار برده می شود و نتیجه مشخص می شود. نتایج برای بیماران و گروه کنترل تنها در صورتی قابل محاسبه است که زمان انعقاد برای آنها در داخل منحنی کالیبراسیون قرار گیرد. اگر زمان انعقاد نمونه ای با رقت ۱:۱۰ کمتر از زمان رقت ۱:۵ نمونه ی رفرنس بود، باید نمونه را ۱:۳۰ رقیق کنید و دوباره آن را آزمایش کنید و نتیجه بدست آمده را در ۳ ضرب کنید. اگر زمان انعقاد از زمان رقت ۱:۳۰ نمونه رفرنس بیشتر بود، نمونه را ۱:۳ رقیق کنید، دوباره آن را آزمایش کنید و نتیجه بدست آمده را در ۱\۳۰ضرب کنید. از رقت های کمتر از ۱:۳ استفاده نکنید زیرا وجود تداخل کننده‌ها ممکن است نتایج نادرستی به همراه داشته باشد.

اگر زمان انعقاد رقت ۱:۳ نیز بیشتر از بیشترین زمان انعقاد مشاهده شده در منحنی کالیبراسیون باشد، نتیجه را بصورت کمتر از پایینترین غلظت منحنی کالیبراسیون گزارش کنید.

کنترل کیفی:

برای اطمینان از صحت و تکرارپذیری نتایج باید از کنترل استفاده کرد. این کنترل ها به صورت رقیق نشده استفاده می شوند. مقادیر به دست آمده برای کنترل ها باید در محدوده ی ذکر شده باشند. اگر مقادیر کنترل خارج از محدوده اعلام شده است، تمام اجزای آزمایش از قبیل شرایط سنجش، معرف ها، همگن بودن پلاسمای مورد آزمایش و غیره را بررسی کرده و در صورت لزوم، آزمایش ها را تکرار کنید.

محدوده ی نرمال

نتایج Fibrinogen تحت تأثیر روش تشخیص لخته است و ممکن است از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر متفاوت باشد. معمولاً میزان زمان انعقاد تست های Fibrinogen با پلاسمای نرمال و به کمک دستگاه کواگولومتر، ۸-۱۰ ثانیه است. هر آزمایشگاه باید محدوده نرمال خود را با توجه به جمعیت بیمار مراجعه کننده تعیین کند. نتایج غیر طبیعی پلاسمای بیمارانی که داروهای ضد انعقادی مصرف نمی کنند، نشان دهنده کمبود فاکتور یا وجود یک مهار کننده می باشد. همچنین این نتایج ممکن است نتیجه داروها یا درمان های خاصی باشد.

جهت تعیین محدوده ی نرمال فیبرینوژن تعداد ۱۵۰ نمونه ی نرمال دارای توزیع نرمال ارزیابی شد که نشان دهنده ی محدوده ی ۳۶۳ mg/d – ۲۳۰ بود.

محدودیت ها و تداخلات

مقدار FDP (fibrin degradation products) تا ۱۳۰ µg/ml، هیرودین تا ۳ µg/ml و هپارین (LMWHوUFH) تا ۲IU/ml باعث تداخل در نتایج تست نمی شود ولی مقادیر بالاتر از این مقادیر باعث تداخل در نتیجه ی تست می شود. همچنین بیلی روبین تا سطح ۱۷ mg/dlو هموگلوبین آزاد پلاسما تا سطح ۴۵۰ mg/dl باعث تداخل در نتیجه تست نمی شوند.

ویژگی های عملکردی

تکرارپذیری :دقت این تست به عوامل زیادی مانند ابزار، تکنیک و معرف مورد استفاده بستگی دارد. جهت ارزیابی تکرارپذیری Intra assay، Inter assay و Reproducibility نمونه های کنترل تجاری نرمال، کنترل تجاری ابنرمال و نمونه های بالینی نرمال و غیر نرمال بر اساس استاندارد CLSI EP۰۵ مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به شرح زیر بود .

Intra assay				
	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری ابنرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی ابنرمال
N	80	80	80	80
Mean	285.435897	104.025	202.9375	92.9125
SD	1.93563354	1.9420399	2.69243549	1.8704480
CV%	0.6781324	1.866897	1.3267313	2.0131285

Inter assay				
	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری ابنرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی ابنرمال
N	80	80	80	80
Mean	279.6125	103.7125	202.975	93.5875
SD	2.95747819	2.32321117	4.0658348	2.06657394
CV%	1.057706	2.24004934	2.00312098	2.20817304

Reproducibility				
	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری ابنرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی ابنرمال
N	75	75	75	75
Mean	282.066667	102.88	205.04	92.84
SD	4.55694698	2.37076792	4.2312863	2.27227711
CV%	1.61555672	2.30440117	2.06363944	2.4475195

خطی بودن نتایج

برای ارزیابی خطی بودن نتایج، از پلاسمای نرمال پولد که دارای ۱۰۰ درصد فعالیت فاکتور I (فیبرینوژن) می باشد، رقت های سریالی توسط پلاسمای FI deficient تهیه و تست شد و تست فیبرینوژن انجام شد. نتایج به شرح زیر بود:

فیبرینوژن	سطح فاکتور(٪)
248.26	100
194.56	50
155.74	20
119.8	10
76.2	5
18.56	3.3
7.24	2.5

مقایسه با کیت مرجع :

در ارزیابی همبستگی نتایج بین کیت حاضر با کیت فیبرینوژن شرکت stago با استفاده از دستگاه کواگولومتر نیمه اتوماتیک استگو نتایج زیر به دست آمد:

	Fibrinogen Correlation
Heamostica fibrinogen vs Stago Fibrinogen N= 100	$y = 0.9979X + 0.6383$ $R^2 = 0.9999$

علایم مورد استفاده در لیبل

IVD	مورد استفاده در آزمایشگاه تشخیص پزشکی
	به دفترچه ی راهنما مراجعه کنید.
+2°C +8°C	در دمای دو تا ۸ درجه نگه داری شود.
	تاریخ انقضا
LOT	لات نامبر
	تاریخ تولید

References

1. CLAUSS A.: “Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens”. Acta Haematol., 17, 237-246, 1957.

2. DESTAING F., DUZER A., FERRAND B., PORTIER A.: “Dosage du fibrinogène par la micro-méthode de coagulation de von A. Clauss”. Pathol. Biol., 8, 17/18, 1615-1621, 1960.

3. CAEN J., LARRIEU M.-J., SAMAMA M.: “L’hémostase. Méthodes d’exploration et diagnostic pratique”. Paris: L’Expansion scientifique, 215-218, 1975.

4. HANTGAN R.R., FRANCIS C.W., SCHERAGA H.A., MARDER V.J.: “Fibrinogen structure and physiology” in “Hemostasis and Thrombosis - Basic principles and clinical practice”, Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J., Salzman E.W., Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 269-288, 1987.

5. SAMAMA M., CONARD J., HORELLOU M.H., LECOMPTE T.: “Physiologie et exploration de l’hémostase”. Paris: Doin, 123-137, 153-155, 1990.

6. COLLET J.P., SORIA J., MIRSHAHI M., HIRSCH M., DAGONNET F.B., CAEN J., SORIA C.: “Dusart syndrome: a new concept of the relationship between fibrin clot architecture and fibrin clot degradability: hypofibrinolysis related to an abnormal clot structure”. Blood, 82, 8, 2462-2469, 1993.

7. ERNST E., RESCH K.L.: “Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature”. Ann. Intern. Med., 118, 12, 956-963, 1993.

8. ALESSI M.C., AILLAUD M.F., JUHAN-VAGUE I.: “Facteurs de risque thrombogènes et athérosclérose”. Feuil. Biol., XXXV, 197, 39-41, 1994.

تهران، خیابان وصال شیرازی، خیابان ایتالیا، بین قدس و وصال، پلاک ۴۱، مرکز جامع سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، طبقه ی هفتم، شرکت شفا آزمای پارسیان تلفن: ۰۲۱۹۱۳۰۵۹۱۹