

بروشور کیت فیبری نوژن هموستیکا

شماره بروشور	SA09	REF
--------------	------	-----

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

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

مقدمه

فیبری نوژن 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). فیبری نوژن در کبد (به میزان ۱/۷ تا ۵ گرم در روز) و نیز توسط ماکاکیوبسیست ها سنتز می شود (۳،۴). به دلیل وجود پلی مورفیسم ژنتیکی برای این ژن، سطح فیبری نوژن پلاسما در افراد مختلف، متفاوت است (۵). نیمه عمر فیبری نوژن حدود ۳-۵ روز است (۴). ترومبین (فاکتور IIa) با اثر بر روی مولکول فیبری نوژن، آن را می شکند تا ۲ قطعه فیبری نوپتید A (FPA)، از زنجیره های $\alpha\alpha$ و ۲ قطعه فیبری نوپتید B (FPB) از زنجیره های $\beta\beta$ را جدا کند (۵). مونومر های فیبری نوژن که از این واکنش ها تولید می شوند، برای تشکیل شبکه ی فیبری نوژن تجمع می یابند و متعاقباً توسط فاکتور XIIIa پایدار می شوند. مرحله اول این تثبیت شامل اتصال دو زنجیره Y از دو مونومر فیبری نوژن است که موجب تولید D-dimer در زمان تخریب فیبری نوژن می گردد (۶).

افزایش سطح فیبری نوژن در دیابت، سندرم های التهابی و نیز چاقی مشاهده می شود (۷). کاهش سطح فیبری نوژن در DIC و فیبری نولیز مشاهده می شود. به نظر می رسد فیبری نوژن در بیماری رایی 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 پلاسما رقیق شده، ارتباط مستقیمی با سطح فیبری نوژن پلاسما دارد (۲، ۳).

در صورتی که ترومبین با غلظت بالا استفاده شود زمان تشکیل لخته در پلاسما رقیق شده، نسبت مستقیم با غلظت فیبری نوژن پلاسما دارد. در این آزمایش، ترومبین با غلظت فراوان به پلاسما رقیق اضافه می شود و زمان لازم برای تشکیل لخته ثبت می گردد.

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 کاملاً 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 سیرتات سدیم ۳/۲٪ انجام شود. نسبت خون به ضد انعقاد باید ۹ به ۱ باشد.
- توجه:** از پلاسما ی دارای ضد انعقاد هپارین، و اگرالات استفاده نشود.
- پلاسما ی مورد استفاده، پلاسما ی فقیر از پلاکت (PPP) است که برای تهیه ی آن باید خون به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۵۰۰ تا 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 پلاسما ی 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، معرفی 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 پایداری 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 تجهیزات که مورد نیاز هستند ولی در کیت موجود نیستند

- دستگاه کوآگولومتر 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
- پلاسما ی کالیبراتور
- پلاسما ی 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 پلاسما ی بیماران باید به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر ایمیدازول رقیق گردد.

روش دستی

- ۱. نمونه ها را به نسبت ۱:۱۰ (۱\۰ میلی لیتر نمونه + ۹\۰ 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. ۱\۲ میلی لیتر از نمونه رقیق شده را به مدت ۲ تا ۳ دقیقه انکوبه کنید.
- ۵. ۱\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 فوراً تایمر را متوقف کرده و زمان را ثبت کنید.
- ۷. غلظت فیبری نوژن را با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه کنید.

روش نیمه اتوماتیک:

- ۱. نمونه ها را به نسبت ۱:۱۰ (۱\۱ میلی لیتر نمونه + ۹\۰ میلی لیتر بافر) رقیق کنید.
- ۱۲\۱ 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 فیبری نوژن 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 پلاسما ی مرجع را مطابق جدول زیر از پلاسما ی کالیبراتور (ترجیحاً STA®-Unicalibrator) تهیه کنید:

حجم بافر (میکرولیتر)	حجم کالیبراتور یا استاندارد (میکرولیتر)	رقت
۴۰۰	۱۰۰	۱:۵
۹۰۰	۱۰۰	۱:۱۰
۱۵۰۰ (یک و نیم سی سی)	۱۰۰	۱:۱۵
۱۹۰۰ (یک و نه دهم سی سی)	۱۰۰	۱:۲۰
۲۹۰۰ (دو و نه دهم سی سی)	۱۰۰	۱:۳۰

رقت ۱:۱۰ پلاسما ی مرجع نشان دهنده ۱۰۰٪ غلظت تخمینی فیبری نوژن است.

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

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

Intra assay				
	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از کنترل تجاری اینترمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی اینترمال
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 اینترمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی اینترمال
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 اینترمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی نرمال	نتایج ارزیابی با استفاده از نمونه بالینی اینترمال
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:

کنید، دوباره آن را آزمایش کنید و نتیجه بدست آمده را در ۰/۳ ضرب کنید. از رقت های کمتر از ۱/۳ استفاده نکنید زیرا وجود تداخل کننده ها 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 کواگلولومتر، 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 ۳۴۳ - ۲۳۰ mg/d بود.

محدودیت ها و تداخلات

مقدار FDP (fibrin degradation products) تا ۱۳۰ µg/ml، هیرودین تا ۳ µg/ml و هپارین (LMWH و UFH) 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/dl و هموگلوبین آزاد پلاسما تا سطح ۴۵۰ mg/dl باعث تداخل در نتیجه تست نمی شوند.

ویژگی های عملکردی

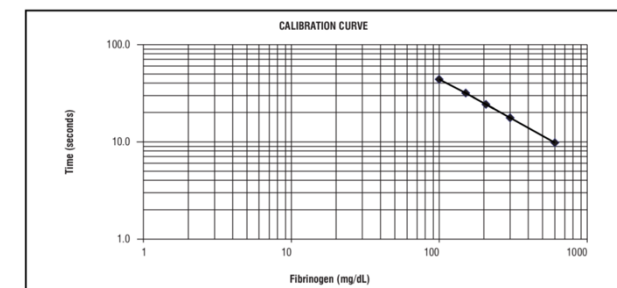
تکرارپذیری: دقت این تست به عوامل زیادی مانند ابزار، تکنیک و معرف مورد استفاده بستگی دارد. جهت ارزیابی تکرارپذیری Intra assay، Inter assay و Reproducibility نمونه های کنترل تجاری نرمال، کنترل تجاری اینترمال و نمونه های بالینی نرمال و غیر نرمال بر اساس استاندارد CLSI EP۰۵ مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج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

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:

Time (sec)	Fibrinogen (mg/dL)	Dilution Factor	Buffer (mL)	STA [®] =Unicalibrator	
				Dilution	Volume (ml)
10	304 x 2 = 608	10/5=2	0.4	1:5	0.1
18	304 x 1 = 304	10/10=1	0.9	1:10	0.1
25	304 x 0.67 = 204	10/15=0.67	1.4	1:15	0.1
32	304 x 0.50 = 152	10/20=0.5	1.9	1:20	0.1
44.8	304 x 0.33 = 100	10/30=0.33	2.9	1:30	0.1



انجام تست برای نمونه ی بیمار

با استفاده از کیت، تست فیبرینوژن برای بیمار انجام شده و زمان به دست آمده بر روی نمودار برده می شود و نتیجه مشخص می شود. نتایج برای بیمار 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

منابع

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.

**در صورت بروز هر گونه مشکل با شماره تلفن مندرج
بر روی جعبه، بخش پشتیبانی فنی تماس بگیرید**

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 کوآگولومتر نیمه اتوماتیک استگو نتایج زیر به دست آمد:

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

علائم مورد استفاده در لیبل

مورد استفاده در آزمایشگاه تشخیص پزشکی	
به دفترچه ی راهنما مراجعه کنید.	
در دمای دو تا ۸ درجه نگه داری شود.	
تاریخ انقضا	
لات نامبر	
تاریخ تولید	