روش اندازه‌گیری فیبرینوژن پلاسما

یکی از نقش‌های فیزیولوژیک سیستم انعقادی، تبدیل فیبرینوژن پلاسما به فیبرین در محل ضربه یا جراحت است. فیبرینوژن در موارد زیر کاهش می‌یابد. آفیبرینوژنمی و هایپوفیبرینوژنمی، برخی موارد دیس‌فیبرینوژنمی، و بعضی حالات اکتسابی مانند انعقاد داخل عروقی منتشر، فیبرینولیز سیستمیک، پانکراتیت، نارسایی شدید کبد بعد از درمان با ال- آسپاراژیناز یا سدیم والپر وآت. هرچند معمولاً در بیماران دارای فیبرینوژن 50 mg/dl خونریزی دیده نمی‌شود، ولی در برخی شرایط استرس زا (جراحی، تروما) ممکن است خونریزی در حالی رخ دهد که میزان فیبرینوژن کمتر یا مساوی ۱۰۰ mg/dl می‌باشد. فیبرینوژن یک واکنشگر فاز حاد است. هایپرفیرینوژنمی همچنین در حالت‌های) (Hypercoaligulable) در افراد مبتلابه ترومبوز) دیده می‌شود. افزایش سطح فیبرینوژن در برخی حالات فیزیولوژیک، مانند حاملگی نیز گزارش شده است. فیبرینوژن به‌عنوان ریسک فاکتور ایجاد بیماری قلبی- عروقی آترواسکلروتیک شناخته شده است. نبود یک پلاسمای رفرانس برای اندازه‌گیری فیبرینوژن، دقت اندازه‌گیری فیبرینوژن در آزمایشگاه‌های متفاوت را مختل می‌سازد. هنوز متدی برای اندازه‌گیری کممی فیبرینوژن توصیه نشده است. گسترده‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده عبارت‌اند از:

آزمایشهای توربیدیمتریک، اندازه‌گیری پروتئین قابل انعقاد، رسوب یادناتوراسیون، روش تغییر یافته TT تام با استفاده از ترومبین (Clauss) یا زهر مار (یک آنزیم شبه ترومبین،) یا تکنیک‌های ایمونولوژیک.

این دستورالعمل، به توصیف روش (Clauss) می‌پردازد که عملی‌ترین و رایج‌ترین روش مورد استفاده جهت اندازه‌گیری فیبرینوژن پلاسما در آزمایشگاه‌ها می‌باشد.

احتیاط‌های کلی

بدلیل عدم اطلاع از آلوده بودن یا نبودن یک نمونه، باید تمام نمونه‌های خون به‌عنوان نمونه بالقوه آلوده تلقی شوند.

اصول

در انعقاد خون طبیعی، فیبرینوژن در حضور آنزیم ترومبین به فیبرین تبدیل می‌شود. این تبدیل در یک فرآیند دو مرحله‌ای صورت می‌گیرد. مرحله اول، پروتئولیز فیبرینو پپتیدهای A و B با واسطه ترومبین است که از زنجیره‌های فیبرینوژن بدست می‌آیند. فیبرینوپپتیدA ، سریع‌تر از B تجزیه می‌شود. بعد از آزاد شدن فیبرینو پپتیدها، فرم فیبرینوژن حاصل در اصطلاح « منومر فیبرین» نام دارد.

در مرحله دوم، این منومرها خودبخود پلیمریزه می‌شوند و اجتماعاتی از پلیمرهای نامحلول فیبرین را تشکیل می‌دهند. تشکیل پلیمرهای نامحلول فیبرین در آزمایشگاه به‌عنوان نقطه پایان واکنش Time ing ف Clotتشخیص داده می‌شود. زمان لخته پلاسمای رقیق شده، نسبت عکس با غلظت فیبرینوژن پلاسما دارد به شرطی که ترومبین با غلظت زیاد استفاده شود. ترومبین با غلظت فراوان به پلاسمای رقیق اضافه می‌شود و زمان لازم برای تشکیل لخته ثبت می‌گردد.

تجهیزات

لوله آزمایش

سیستم‌های حمل و نقل پلاستیکی

Heating Blockجهت تامین دمای$37(^{o}c\pm1)$

معرف‌ها

معرف‌های تجاری

معرف‌های غیرتجاری

در صورت عدم استفاده از معرف‌های تجاری استفاده از معرف‌های زیر توصیه می شود.

بافر باربیتال$(PH= 7.4+ 0.05)$

ترومبین (انسانی یا گاوی)

با واحد NIH معلوم، که باید در ظروف پلاستیکی به حالت لیوفیلیزه نگهداری شوند. محلول استوک ترومبین منجمد با ۱۰۰۰NIH Units/ml حداقل یکسال در c° ۷۰ -پایدار می‌ماند.

پالاسمای کنترل طبیعی

که می‌تواند به‌صورت یک Pool از پلاسمای نرمال باشد که در آزمایشگاه تهیه شده و یا از پلاسمای کنترل تجاری درصورتی‌که لیوفیلیزه باشد باید تا تاریخ انقضاء در c°8-2 نگهداری شود و در c°-20≥ حداکثر تا ۶ ماه قابل نگهداری است.

کنترل غیرطبیعی

در هر سری آزمایش، حداقل یک کنترل غیرطبیعی، فیبرینوژن پایین (۸۰-۱۲۰ mg/dl)نیز باید آزمایش شود. این کنترل‌ها به‌صورت تجاری موجودند. همچنین می‌توان از رقیق کردن Pooled Normal Plasmaبا بافر باربیتال آنها را تهیه نمود.

منحنی استاندارد

روش

1- نمونه خون را به همراه ماده ضد انعقاد سیترات تهیه کنید. از لوله‌های حاوی EDTA یا هپارین جهت نمونه‌گیری استفاده نشود.

۲- پلاسما را به نسبت ۱:۱ در بافر باربیتال رقیق کنید 0.2 ml .از پلاسمای رقیق شده در یک لوله آزمایش بریزید و ۴۶ دقیقه در c°37 1 ±بگذارید. آزمایش را برای هر نمونه به‌صورت Duplicate انجام دهید.

3- استوک ترومبین را با بافر باربیتال رقیق نمایید، محلولNIH 100 units/ml بدست می‌آید. این محلول نباید قبل از استفاده منجمد شود و بمدت یک ساعت در ^{o}c 8-2 پایدار است.

4 -1mlترومبین (۱۰۰ NIH Units/ml)را به پلاسما اضافه کنید و همزمان کرونومتر را بکار اندازید.

5- اختلاف بین نتایج Duplicate باید در محدوده ۷٪ از میانگین آن‌ها باشد. در صورت نیاز به تهیه منحنی استاندارد، با استفاده از رقت‌های مختلف پلاسمای رفرانسی و زمان‌های حاصل برای هر وقت می‌توان منحنی استاندارد را رسم نمود.

۶- براساس زمان انعقاد بدست آمده برای نمونه و مقایسه آن با منحنی استاندارد، میزان فیبرینوژن نمونه را مستقیماً از روی منحنی استاندارد بخوانید.

منابع خطای آنالیتیک

جمع‌آوری ناقص نمونه

۱- زیاد یا کم پر کردن لوله‌های خونگیری

۲- عدم اصلاح حجم سیترات لازم برای افرادی که هماتوکریت بالایی (۰/۵۵) دارند.

۳-استفاده از ماده ضد انعقاد نامناسب، عدم استفاده از ضد انعقاد، آلودگی با هپارین

۴- نمونه لخته، همولیز، یرقانی، لیمپیک

۵-مخلوط کردن ناکافی یا بسیار زیاد یک نمونه

۶- آلودگی لوله‌های نگهداری نمونه

ناکافی بودن ترومبین

به دلایل زیر، ممکن است ترومبین به اندازه کافی موجود نباشد:

۱- آلودگی بافر یا معرف

۲- آماده‌سازی با مقدار ناکافی بافر

۳- نقص در فرآورده

۴- نگهداری در ظرف شیشه‌ای

۵- نگهداری طولانی ترومبین

شرایط نامناسب خطاهای آزمایشگاهی که بر شرایط اثر می‌گذارند عبارت‌اند از: استفاده غلط از زمان انکوباسیون: دما،PH ، حجم یا روش‌های دستگاهی

جذب زمینه‌ای بالا

اندازهگیری فیبرینوژن با استفاده از Spectrophotometric End Points ممکن است تحت تأثیر هموگلوبین زیاد پلاسما یا نمونه‌های لیمپیک قرار گیرد. از این رو، این تداخلات ناشی از جذب زمینه‌ای بالا موجب بدست آوردن نتایج بشدت پایین فیبرینوژن می‌گردد.

آزمایش حل شدن فیبرین، زمان لیز شدن لخته(Whole Blood Clot Lysis Time)

نام آنالیت: لخته

ساختمان و متابولیسم :مراجعه به فیبرینوژن

معرفی آزمایش، کاربرد بالینی :زمان حل شدن لخته خون بازتابی از فعالیت دستگاه فیبرینولیتیک در رابطه با فعالیت پلاسمین است. لیز شدن لخته زمانی کامل است که خون حالت سیال پیدا کند. لیز شدن پیش از ۲۴ ساعت غیرطبیعی و گویای افزایش فعالیت دستگاه فیبرینولیتیک است. در فیبرینولیز و درمان فیبرینولیتیک زمان کاهش می‌یابد.

	محدوده طبیعی
مقدار طبیعی	72-48 ساعت
فیبرینولیز با اهمیت	24‹ ساعت
فیبرینولیز شدید	2‹ ساعت
در روش رقیق شده لیز در	7-2 ساعت

اساس روش متداول :بررسی زمان لخته شدن خون، یک میلی‌لیتر خون را در لوله ای (۷۵,۱۰ میلی‌متری) ریخته و آن را در ۳۷ درجه قرار می‌دهیم تا لخته شود. این لوله را دست کم برای ۲۴ ساعت دیگر هم در ۳۷ درجه قرار می‌دهیم و بعد وجود لیز در آن بررسی می‌شود

روش مرجع- :

روش ارجح- :

روش‌های دیگر :لیز لخته خون کامل، خون کامل رقیق شده در بافر فسفات(thompson)

نوع نمونه قابل اندازه‌گیری :در روش لخته از خون کامل که در ۳۷ درجه لخته شده استفاده می‌شود و در روش دوم آن را با بافر فسفات رقیق می‌کنند.

واکنش تداخلی :در شرایط داخل بدن :(invivo) مصرف آمینو کاپروئیک اسید در افزایش وAlteplase ، آنتی استرپلاز، استرپتوکیناز و یوروکیناز در کاهش آن مؤثرند.

معایب و فواید روش حاضر: طولانی بستن تورنیکه و آسیب وارده به هنگام خونگیری ممکن است فعالیت فیبرینولیتیک را افزایش د**هد .**سطح فعال‌کننده پلاسمینوژن، پلاسمین، پلاسمینوژن و مهارکننده‌های

فیبرینولیتیک روی این آزمایش مؤثرند. اگر فیبرینوژن کمتر از 50 mg/dl باشد لخته ممکن است تشکیل نشود یا دیدنش مشکل باشد.