

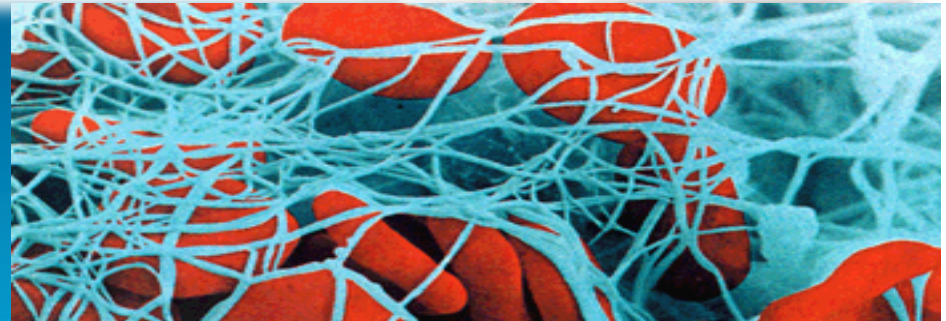
Определение концентрации фибриногена плазмы крови: выбор метода исследования

Золовкина Анна Геннадьевна

к.м.н., доцент

ТЕХНОЛОГИЯ  СТАНДАРТ

ОТ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ –
К ВЫСОКИМ СТАНДАРТАМ



Фибриноген

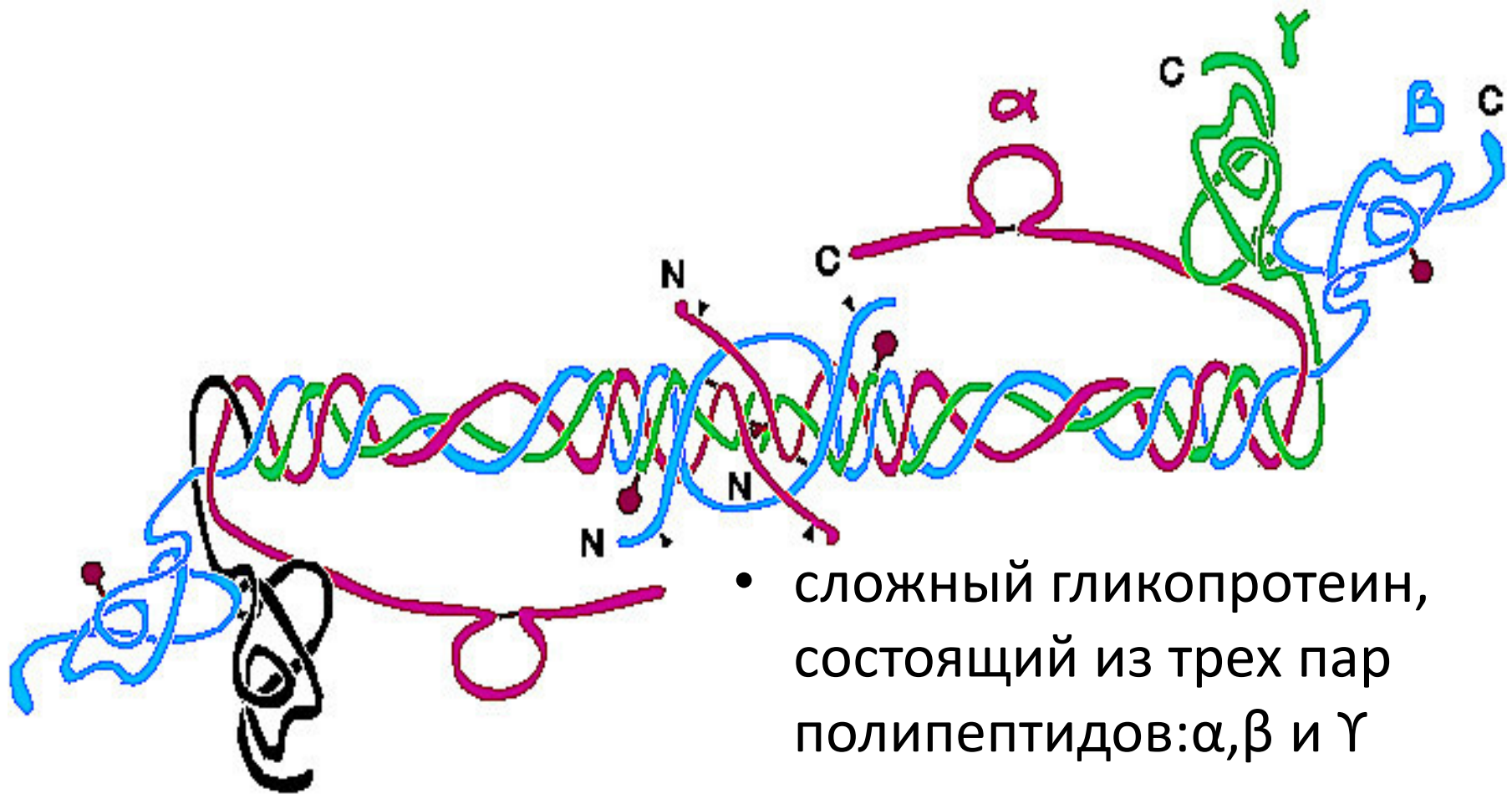
гликопротеин плазмы крови синтезируется в печени
в количестве 2-5 г в день,
время его полувыведения около 4-х дней

Функции:

- образование фибринового сгустка,
- заживление ран,
- фибринолиз,
- воспаление,
- ангиогенез,
- клеточное и структурное взаимодействие,
- неоплазия

Референтные значения 2,0 -4,0 г /л

концентрация может увеличиться на 200-400% во время физиологического стресса



- сложный гликопротеин, состоящий из трех пар полипептидов: α , β и γ
- полипептиды связаны друг с другом 29 дисульфидными СВЯЗЯМИ

(H. Cote, adapted from R. F. Doolittle)

Клинико-диагностическое значение

Гиперфибриногенемия – повышение уровня фибриногена в крови.

Является фактором повышенного риска развития артериальных тромбозов и инфарктов органов.

Физиологическое: холодное время года, беременность, менструация, постменопауза

Патологическое повышение:

- Реакции острой фазы (лихорадка, инфекционные болезни, воспалительные и некротические процессы; травмы, ожоги, хирургические операции).
- Злокачественные опухоли, метастазирование
- Курение
- Оральные контрацептивы

**(Eliasson et al, 1993; Hantgan et al, 1994; Lowe et al, 1997; Kluft & Lansink, 1997; van der Bom et al, 1997; Humphries et al, 1999).*

Клинико-диагностическое значение

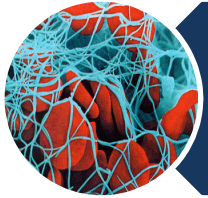
Гипофибриногенемия – снижение концентрации уровня фибриногена в крови.

- Наследственный дефицит фибриногена (а- и дисфибриногенемия)
- ДВС-синдром (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания)
- Гемодилюция кровезаменителями
- Декомпенсированные болезни печени (вирусные гепатиты, цирроз)

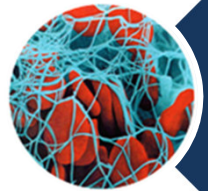
Уменьшение содержание фибриногена плазмы до уровня ниже 1 г/л служит фактором риска появления кровотечений из сосудов внутренних органов

**(Eliasson et al, 1993; Hantgan et al, 1994; Lowe et al, 1997; Kluft & Lansink, 1997; van der Bom et al, 1997; Humphries et al, 1999).*

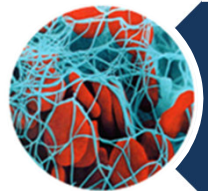
Историческая справка



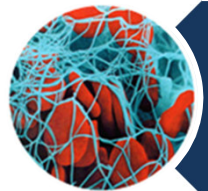
R. Virchow в 1847 году предположил, что существует некий растворимый предшественник в плазме, из которого и формируется кровяной сгусток



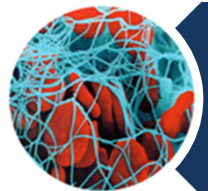
в 1859 году Deni de Commercy впервые предложил для этого предшественника термин «фибриноген»



в 1876 году выделен Олафом Хаммарстен (Швеция) из плазмы лошадей



В 1904 году А. Шмидт наряду с тромбином определил центральную роль F I в коагуляционном каскаде



В 1909 году, фибриноген впервые был выделен в хорошо очищенном виде

Методы определения концентрации фибриногена в крови

Нефункциональные методы:

- высаливания или тепловой преципитации фибриногена с последующим количественным исследованием коагулята (объемным методом, фотометрией)
- образование стабильного фибрина с последующим выделением и взвешиванием
- фотометрическое определение после растворения фибрина при помощи биуретового реактива
- иммунологический метод

Функциональные методы

- определение по Клауссу с тромбином
- турбидиметрическая модификация с батроксобином

Определение содержания фибриногена весовым (гравиметрическим) методом по Рутберг Р.А.

Принцип. Образовавшийся после свертывания плазмы крови фибрин быстро высушивается, и по весу определяют содержание фибриногена в плазме.

Реактивы: 1. Хлорид кальция, 5% раствор; 2. Эмульсия тканевого тромбoplastина на трис-буфере, 0,05 М (или буфере Михаэлиса), рН 7,3-7,4

Материал для исследования: цитратная плазма

Ход определения:

К 1,0 мл плазмы в пробирке добавляют 0,1 мл эмульсии тромбoplastина (или раствор тромбина) и 0,1 мл 5% р-ра хлорида кальция. Реагенты перемешивают стеклянной палочкой. Палочку оставляют в пробирке. Смесь инкубируют в термостате с прозрачными стенками (ТПС) или на водяной бане (37° С) 10 - 20 мин, после чего образовавшийся сгусток переносят на фильтровальную бумагу и высушивают путем отжима и перемещения сгустка по бумаге. Сгусток взвешивают на торсионных весах. В норме масса сгустка фибрина составляет 9 – 18 мг.

Расчет: для определения концентрации фибриногена, выраженной в г/л, массу фибрина в мг умножают на коэффициент 0,222.

Фибриноген в г/л = мг фибрина × 0,222

Норма в плазме: 2 – 4 г/л

Сгусток может быть рыхлым вследствие наличия ингибиторов тромбообразования

Большой объем используемой плазмы ограничивает использование в педиатрии

Экономичен

Данный этап практически невозможно стандартизировать!
Сильное отжимание - приводит к потерям фибрина
Слабое отжимание - к ложному завышению уровня фибриногена

Максимальный контакт персонала с кровью

Иммунологические методы определения концентрации фибриногена и электрофорез

- иммуноферментный анализ (ELISA)
- радиальная иммунодиффузия
- иммунонефелометрии
- электрофорез



Измерение концентрации белка, а не его функциональной активности

Занимает много времени

Ложные результаты при наличии ПДФ

Использование моноклональных антител к разным антигенам фибриногена позволяет выявлять функциональные формы

Рекомендован к использованию для оценки риска сердечно-сосудистых заболеваний

Fibrinogen antigen measurement is suitable for studies assessing fibrinogen as a risk factor for cardiovascular disease (Cremer et al, 1994; Sweetnam et al, 1996, 1998)

Определение концентрации фибриногена в протромбиновом тесте (PT derived Fibrinogen)

Анализатор калибруется при исследовании протромбинового время плазмы (или серии разведений плазмы) с известной концентрацией фибриногена и построения графиков изменения оптической плотности по отношению к концентрации фибриногена в логарифмических шкалах
Применение PT-Fg метода обеспечивает быстрое измерение фибриногена без каких-либо дополнительных затрат

Метод применим только на автоматических анализаторах

Результаты зависят от метода калибровки, типа анализатора и реагентов, и оптической прозрачности пробы

Не рекомендован к применению

- у больных с ДВС,
- заболевания печени,
- заболевания почек,
- дисфибриногенемией,
- с высоким или низким уровнем фибриногена

• получавших антикоагулянты,
• тромболитической терапией
Guidelines on fibrinogen assays British Journal of Haematology, 2003, 121, 396-404

Корреляция с методом Clauss нелинейная (сигмовидная)



Метод Clauss

Clauss, A. (1957) Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. Acta Haematologica, 17, 237–246.

К плазме крови добавляют тромбин высокой активности и измеряют время образования сгустка.

Метод рекомендован для разных групп пациентов

Расчет концентрации фибриногена проводят по калибровочной кривой построенной в логарифмических шкалах.

Построение калибровочных кривых позволяет адаптировать любой прибор к набору реагентов

Для исследования используют плазму крови разведенную буфером в 10 раз.

Дополнительные разведения образца необходимы если превышен диапазон линейности

Диапазон значений при стандартном разведении плазмы от 1 до 5 г/л

Малочувствителен к гепарину в терапевтических дозах и ПДФ

Выполняется на коагулометрах с механическим и оптическим типом детекции образования сгустка

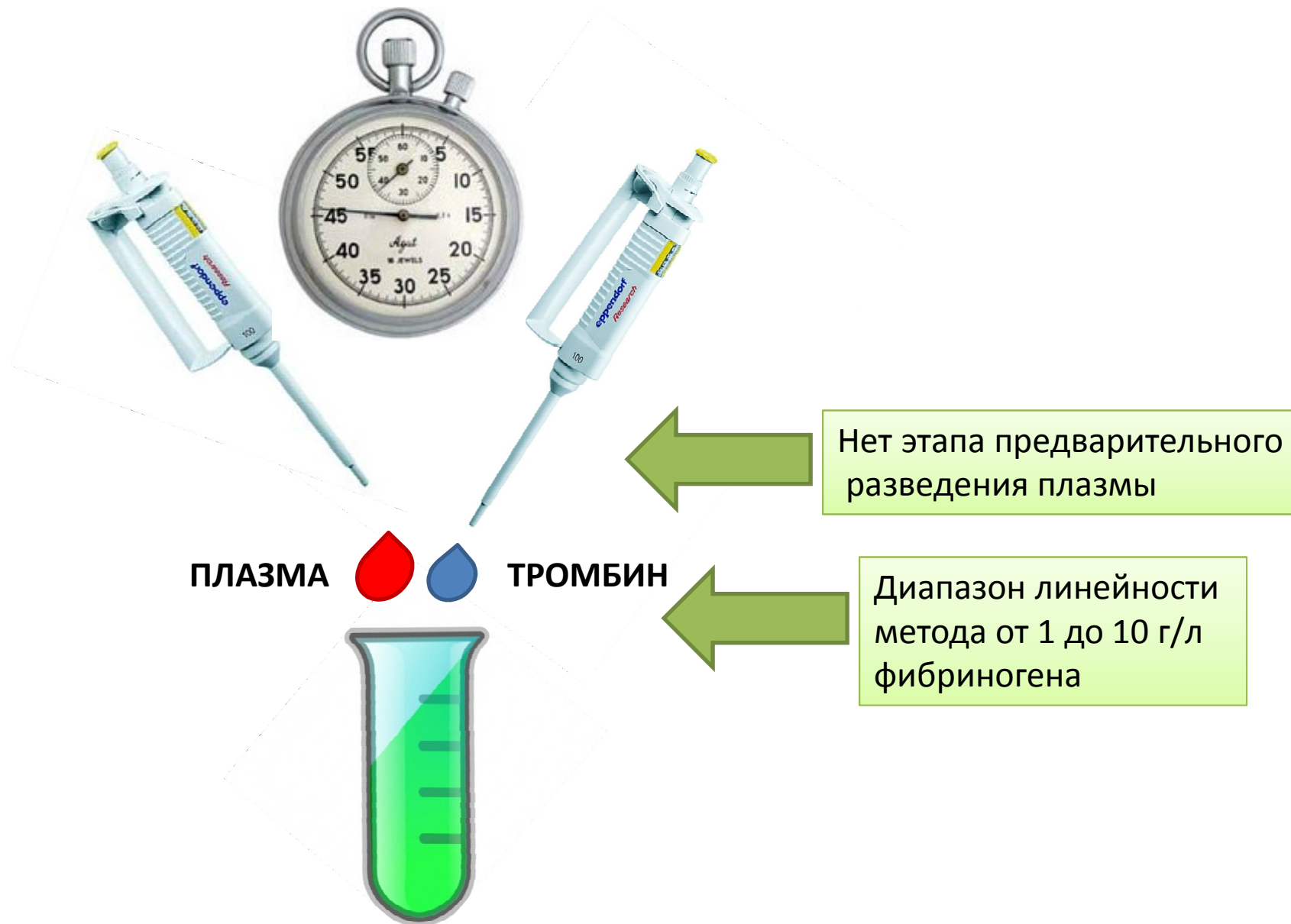
Исследование может быть выполнено на коагулометре с любым вариантом регистрации образования сгустка



Классический метод Clauss



Модифицированный метод Clauss



Наборы реагентов модифицированного метода CLAUSS в России



Калибровка



Сравнение тест-систем

	Fibrinigen	Fibrinogen Reagent	Опти-Фибриноген-тест	Фибриноген-тест	Тех-Фибриноген-тест	Multifibren U	МультиТех-Фибриноген (Технология-Стандарт)
г/л	Разведение плазмы 1:10					Цельная плазма	
0.60	+	±	-	+	±	±	±
1.10	+	+	+	+	+	+	+
2.30	+	+	+	+	+	+	+
3.40	+	+	+	+	+	+	+
5.60	+	+	+	+	+	+	+
8.40	-	-	-	-	-	+	+

Благодарю за внимание!

Золовкина Анна Геннадьевна

к.м.н., доцент

ТЕХНОЛОГИЯ  СТАНДАРТ

ОТ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ –
К ВЫСОКИМ СТАНДАРТАМ

