

Fibrinogen degradační produkty (FDP)

FDP Assay Kit - FDP Control Set – FDP Latex Reagent – FDP Sample Collection Tubes – Glycine Buffered Saline

I. POUŽITÍ

Pacific Hemostasis Set na stanovení fibrin(ogen) degradačních produktů, kontrolní set, latexové reagens, glycinový pufr a odběrové zkumavky, jsou určeny pro detekci fibrinoge/fibrin degradačních produktů (FDP) v séru nebo moči.

II. SOUHRN A PRINCIP

Fibrinogen/fibrin degradační produkty (FDP) se nacházejí v nízkých množstvích v séru všech zdravých jedinců. Je to odraz dynamiky normálního fibrinolytického mechanismu přítomného in vivo, který kontroluje rozsah fibrinových depozit. Normální množství FDP v séru dospělých je 4.9 ± 2.8 ug/ml (1). Lehké zvýšení se může objevit po stresu, tělesné zátěži a strachu (2).

Zvýšení množství FDP v séru může být způsobeno primárním nebo sekundárním rozpadáváním fibrinogenu doprovázejícím intenzivní srážení krve. Zvýšené množství FDP je spojeno s takovými trombotickými stavy jako jsou diseminované intravaskulární srážení (DIC) (3), hluboká venózní tromboza (4), některé poruchy v těhotenství (5,6), infarkt myokardu (7) a plicní embolie (8).

Moč obsahuje normálně méně než 0.25 ug FDP/ml (9). Zvýšené množství FDP v moči se objevuje u pacientů trpících určitými typy onemocnění ledvin jako je glomerulonefritida (10) a akutní rejekce transplantátu.

Set na stanovení fibrin(ogen) degradačních produktů využívá metody přímé latexové aglutinace ke stanovení přítomnosti zvýšených FDP v séru nebo moči. Latexové částice potažené protilátkou proti lidskému fibrinogenu se smíchají s defibrinovaným naředěným sérem nebo močí a aglutinace se odečítá makroskopicky.

III. Reagencie

Diagnostikum je určeno pro použití in vitro.

Všechny reagencie se uchovávají při +2 až +8°C.

A. Latexové diagnostikum: suspenze polystyrenových latexových částic senzibilizovaných králičí protilátkou proti lidskému fibrinogenu. Obsahuje pufr a antiseptikum.

B. Odběrové zkumavky: Pro krev nebo moč. Zkumavky obsahují Batroxobin, enzym podobný trombinu, který rychle konvertuje fibrinogen na fibrinové vlákno. Batroxobin není inhibován antitrombinem III a heparinem (12, 13). Trypsinový inhibitor ze sojových bobů zabraňuje plasminové degradaci fibrinového vlákna. Zkumavka také obsahuje antiseptikum.

C. Glycinový pufr: pufr s antiseptikem.

D. Pozitivní FDP kontrola: >1 ug/ml lidského fibrinogenu v glycinovém pufru se stabilizátory a antiseptikem.

E. Negativní FDP kontrola: <1 ug/ml lidského fibrinogenu v glycinové pufru se stabilizátory a antiseptikem.

Upozornění: Latexové diagnostikum, glycinový pufr, pozitivní a negativní kontrola obsahují azid sodný. Azid sodný tvoří v kyselém prostředí vysoce toxické sloučeniny. Azid sodný může být toxický při požití, dále při kontaktu s olovem nebo mědí v odpadové instalaci mohou vznikat vysoce toxické a výbušné soli. K odstranění je nutno použít velké množství oplachové vody.

Upozornění: Všechny materiály, které byly použity při výrobě pozitivní a negativní FDP kontroly byly vyšetřeny na nepřítomnost HBsAg, anti-HCV a anti-HIV dle doporučených metod FDA. Nicméně všechny produkty vyráběné z lidské krve musí být považovány za potenciálně infekční a při manipulaci s nimi je nutno zachovávat předepsané podmínky bezpečnosti práce.

Neočekávané výsledky a odlišné zbarvení diagnostik mohou znamenat poškození výrobku. FDP odběrové zkumavky mohou selhat při odběru >2ml krve v případě úniku vakua z kompatibilního odběrového systému.

IV. VZOROVÝ ODBĚR

Krev

- A. Zkumavka se plní dokud se vakuum nevyčerpá a proud krve se nezastaví. FDP odběrové zkumavky by se měly naplnit 2 ml krve. Přesný objem odebrané krve se může měnit, ale měl by být 2 ml. Zkumavky se mohou plnit také ručně, zátkou se sejme a zkumavka se naplní 2 až 3 ml krve. Po odběru se každá zkumavka zamíchá několikrát jemným převrácením.
- B. Brzy po odběru krve by se mělo ve zkumavce objevit fibrinové vlákno. Separace séra se může urychlit centrifugací při nízkých otáčkách. Nebo se vzorek sražené krve obkrouží, aby se usnadnila retrakce, a nechá se stát při obyčejné teplotě 15 až 30 minut. U heparinizované krve nedochází k opožděné retrakci.
- C. Nejvhodnější je testovat oddělené sérum ihned po separaci fibrinového vlákna, ale sérum se může testovat do 3 dnů uchovávané při teplotě +2 až +8°C. Sérum se nemrazí.

Moč

- A. Může se použít pouze čerstvá, nezakalená moč bez kontaminace menstruační krví.
- B. Požadované množství moče se přenese do odběrové zkumavky, která se uzavře zátkou a zamíchá se několikrát obrácením.
- C. Vzorky moče se testují ihned. Nemrazit!

V. POSTUP

Materiál:

Pacific Hemostasis Set na stanovení fibrinogen degradačních produktů:

Latexové reagens: kapací lahvička á 5 ml.

Pozitivní FDP kontrola: kapací lahvička á 2 ml.

Negativní FDP kontrola: kapací lahvička á 2 ml.

Glycinový pufr: kapací lahvička á 100 ml.

Odběrové zkumavky: 30 kusů

100 ks dřevěných míchacích tyčinek

jedno sklíčko se 6 jamkami

30 ks plastických pipet.

Poznámka: Latexové reagens (1 x 5 ml) Glycinový pufr (2 x 100 ml), a FDP odběrové zkumavky (30 nebo 100) se mohou objednat zvlášť. K dispozici je také kontrolní set s 3 x 2 ml FDP pozitivní kontroly a 3 x 2 ml FDP negativní kontroly.

Další požadované materiály

Skleněné nebo plastické zkumavky, stopky a pipety pro přídatná ředění.

- A. Před testováním se vzorky zahřejí na obyčejnou teplotu.
- B. Čisté testovací zkumavky se označí 1:10 a 1:40 pro každý vzorek séra. Moč se testuje neředěná a ředěná 1:10.
- C. Pomocí děleného kapátka se nakape 0.45 ml glycinového pufru do zkumavky 1:10 a 2.0 ml do zkumavky 1:40.
- D. Plastikovou pipetou se kápne 1 kapka (50 ul) do obou označených zkumavek.
- E. Plastiková pipeta se promyje vodou a pomocí ní se přenese jedna kapka z každého ředění do jednotlivých jamek na sklíčku.
- F. Do dalších jamek sklíčka se kápne kapka pozitivní a negativní kontroly.
- G. Latexová suspenze se důkladně promíchá obrácením uzavřené lahvičky, nebo vortexem 2-3 sekundy.
- H. Pomocí kapátka se kápne ke každé kapce na sklíčku 1 kapka latexové suspenze.
- I. Dřevěnou míchací tyčinkou se rozmíchá obsah každé jamky po celé ploše testovací jamky.
- J. Testovací sklíčko se 3 minuty jemně naklání krouživým pohybem.
- K. Pod zdrojem přímého světla se zkoumá každá jamka na přítomnost aglutinace. Negativní jamky by měly být hladké bez vláken. Všechny vzorky s hraniční aglutinací se musí porovnat s jamkou s negativní kontrolou.

VI. VÝSLEDKY

Latexové diagnostikum je citlivé ke stanovení 1 ug/ml FDP.

Moč			Sérum		
Neředěná	1:10	Zpráva	1:10	1:40	Zpráva
Negativní	Negativní	<1 ug/ml	Negativní	Negativní	<10 ug/ml
Pozitivní	Negativní	>1 ug/ml	Pozitivní	Negativní	10-40 ug/ml
Pozitivní	Pozitivní	>10 ug/ml	Pozitivní	Pozitivní	40 ug/ml

Při kvantitativním stanovení se pokračuje v sérii ředění tak, až se dosáhne negativního výsledku. Při hodnotě FDP >320 ug/ml by se měla zahájit trombolytická léčba. Při hodnotách >400 ug/ml se v jamce s ředěním 1:10 může objevit negativní nebo slabě pozitivní aglutinace (prozona).

VII. OMEZENÍ

- A. Falešně pozitivní aglutinace se může objevit u silně lipemických nebo bakteriálně kontaminovaných vzorků.
- B. Falešně pozitivní FDP reakci může způsobit i revmatoidní faktor (RF). Jak RF tak FDP způsobují aglutinaci, a proto se nemůže provést přímé hodnocení FDP. Revmatoidní faktor se může odstranit redukčním činidlem jako např. dithiothreitem nebo 2-mercaptoethanolem (14).
- C. Zamražené vzorky mohou vykazovat arteficiálně sníženou hladinu FDP. Vzorky se nemrazí.

VIII. VLASTNOSTI

- A. **Přesnost:** 12 vzorků séra s rozdílnými hodnotami FDP se podrobilo 10 opakovaným stanovením s identickými titry.
- B. **Srovnávací metoda:** Korelační studie provedené nezávislými laboratořemi, které srovnávaly Pacific Hemostasis set s jinými komerčně vyráběnými latexovými testy dávají korelační koeficient v rozpětí od 0.84 do 0.99.
- C. **Vliv heparinu:** Pacific Hemostasis Set na stanovení FDP není ovlivněn heparinem do 2.0 U/ml. Jiné testy používající defibrinaci trombinem mohou stanovovat falešně zvýšené hodnoty FDP, v přítomnosti méně než 0.1 U/ml heparinu.