

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
Porovnání reagensů a kalibrátorů na stanovení
fibrinogenu

Štěpánka Jakubcová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Sadílek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu RNDr. Petru Sadílkovi, Ph.D., za pomoc při psaní mé bakalářské práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 5.8.2022

Štěpánka Jakubcová

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT.....	6
3.	ABSTRACT.....	7
4.	ÚVOD.....	8
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
6.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
6.1	Fibrinogen.....	10
6.2	Historie fibrinogenu.....	10
6.3	Struktura fibrinogenu.....	11
6.4	Syntéza a metabolismus fibrinogenu.....	12
6.5	Funkce fibrinogenu v hemostáze.....	13
6.5.1	Primární hemostáza.....	14
6.5.2	Plazmatický koagulační systém.....	14
6.5.3	Přeměna fibrinogenu na fibrin.....	15
6.5.4	Fibrinolytický systém.....	17
6.6	Metody stanovení fibrinogenu.....	20
6.6.1	Claussova metoda.....	20
6.6.2	Kinetické měření.....	20
6.6.3	Kinetická turbidimetrie.....	21
6.6.4	Imunochemické testy.....	21
6.7	Koncentrace fibrinogenu v plazmě.....	21
6.8	Afibrinogenémie, hypofibrinogenémie, dysfibrinogenémie.....	21
6.8.1	Afibrinogenémie.....	22
6.8.2	Hypofibrinogenémie.....	22
6.8.3	Dysfibrinogenémie.....	23
6.8.4	Léčba krevními deriváty.....	24
7.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	25
7.1	Vyšetřovaný materiál.....	25
7.2	Automatický koagulometr STA-R Evolution.....	25
7.3	Princip metody stanovení fibrinogenu.....	27
7.4	Použité reagensy.....	27
7.4.1	Reagensy DG-FIB L Human.....	28
7.4.2	Reagensy STA-Liquid Fib.....	28
7.5	Nastavení přístroje.....	29
7.6	Kalibrace metod.....	29
7.7	Kontrola kvality.....	30
7.7.1	Reagensy pro kontrolu mezilehlé preciznosti.....	31

7.7.2	Reagencie pro kontrolu přesnosti.....	31
7.8	Pracovní postup.....	32
7.9	Výsledky a jejich statistické vyhodnocení	33
7.9.1	Hodnocení grafů.....	34
8.	DISKUSE.....	36
9.	ZÁVĚR.....	38
10.	POUŽITÉ ZKRATKY	39
11.	SEZNAM TABULEK.....	41
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ	41
13.	SEZNAM GRAFŮ.....	41
14.	POUŽITÁ LITERATURA.....	42
15.	PŘÍLOHY.....	45

2. ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá zavedením nové reagensie používané ke stanovení koncentrace fibrinogenu do provozu hematologické laboratoře.

V teoretické části je popsán fibrinogen včetně jeho struktury, syntézy a patofyziologie. Dále jsou zde popsány možnosti stanovení fibrinogenu a jeho úloha v hemostáze.

Praktická část se zaměřuje na provedení srovnávací studie dvou reagensií – původně používané v laboratoři (DG-FIB L Human) a nově zaváděné (STA-Liquid Fib). V rámci této studie bylo vyšetřeno 71 vzorků plazmy pacientů FN HK, které byly současně měřeny oběma reagensiemi. Pro statistické vyhodnocení výsledků měření byla použita metoda lineární regrese a Bland-Altmanův graf.

Metoda lineární regrese ukazuje na dobrou korelaci obou metod, o které vypovídá hodnota korelačního koeficientu $r = 0,9869$ a rovnice přímky $y = 1,1636x - 0,3294$. Bland-Altmanův graf také vypovídá o dobré shodě výsledků naměřených původní a novou reagensií.

Z provedené srovnávací studie vyplývá, že obě reagensie poskytují srovnatelné výsledky. Reagensie STA-Liquid Fib může být zavedena do laboratorního provozu.

Klíčová slova: fibrinogen, hemostáza, Claussova metoda, srovnávací studi

3. ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the introduction of a new reagent used for the examination of fibrinogen concentration in the hematology laboratory.

The theoretical part describes fibrinogen, including its structure, synthesis and pathophysiology. Furthermore, the possibilities of determining fibrinogen concentration and its role in hemostasis are described.

The practical part focuses on a comparative study of two reagents – the first has previously been used in the laboratory (DG-FIB L Human) and the second is newly introduced (STA-Liquid Fib). In this study, 71 plasma samples of FN HK patients were examined, using both reagents. The results were analyzed using linear regression and the Bland-Altman graph.

The linear regression showed a good correlation between the two methods, indicated by the correlation coefficient $r = 0.9869$ and the equation of the straight line $y = 1.1636x - 0.3294$. The Bland-Altman plot also indicated a good agreement between the results obtained using the original and new reagents.

This comparative study indicates that both methods provide comparable results, and provides that the STA-Liquid Fib reagent could be suitable for laboratory use.

Key words: fibrinogen, hemostasis, Clauss method, comparative study

4. ÚVOD

Fibrinogen je glykoprotein, který hraje důležitou roli v procesu srážení krve (v hemostáze). Na hemostáze se kromě fibrinogenu podílí i řada dalších koagulačních faktorů a složek. Fibrinogen zajišťuje v primární hemostáze agregaci krevních destiček, v koagulační kaskádě je štěpen trombinem na fibrin. Takto vytvořená krevní sraženina je nakonec rozpuštěna fibrinolytickým systémem.

Stanovení koncentrace fibrinogenu se dnes nejčastěji provádí na automatickém koagulometru s využitím Claussovy metody. K tomuto koagulačnímu stanovení jsou nezbytné komerčně vyráběné reagentie obsahující trombin, který štěpí fibrinogen ve vyšetřované plazmě pacienta na fibrin. Měří se koagulační čas od přidavku startovací reagentie do detekce koagula přístrojem a z kalibrační křivky se odečítá koncentrace fibrinogenu v plazmě.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na zavedení nové reagentie potřebné pro vyšetření fibrinogenu do laboratorní praxe. Aby se v laboratoři mohla tato nová reagentie začít používat, musí se provést srovnávací studie s reagentií původní, dosud používanou.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části mé bakalářské práce je popsat fibrinogen a jeho funkci v hemostáze. Dále pak metody stanovení a patofyziologii fibrinogenu.

Cílem praktické části práce je provést a vyhodnotit srovnávací studii dvou reagensů (původní a nově zaváděné) používaných na stanovení fibrinogenu. Obě reagensie musí poskytovat srovnatelné výsledky. Protože se dopředu vědělo, že se původní reagensie od firmy Grifols přestane vyrábět, měla laboratoř dostatek času k provedení srovnávací studie. Laboratoř se rozhodla pro novou reagensii od firmy Stago vzhledem k současně používaným koagulometrům od této firmy.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Fibrinogen

Fibrinogen je glykoprotein přítomen v lidské krevní plazmě, který je nezbytný pro hemostázu. V hemostáze se podílí na agregaci aktivovaných trombocytů a na tvorbě nerozpustné krevní sraženiny přeměnou na fibrin, která je následně rozpuštěna fibrinolytickým systémem. Molekula fibrinogenu se skládá ze tří párů polypeptidových řetězců, které jsou uspořádány do domén. Syntéza fibrinogenu probíhá převážně v játrech (Weisel, 2005).

6.2 Historie fibrinogenu

Koncem 17. století Malpighi mikroskopicky zkoumal krevní koagulum, které má vláknitou a korpuskulární složku. Termín fibrin zavedl Fourcroy v roce 1801. Prokázal, že prekurzor fibrinu byl přítomen v plazmě, ale ne v séru. V roce 1847 R. Virchow poprvé použil termín fibrinogen. Ve skutečnosti Virchow fibrinogen neobjevil. V té době Virchow experimentoval spíše s exsudáty než s plnou krví, a proto mylně aplikoval termín fibrinogen na rozkládající se exsudáty spíše než na prekurzor fibrinu. Denis (v knize *Mémoire sur le sang* z roku 1859) byl první, kdo rozpoznal plazmatický fibrinogen jako prekurzor fibrinu. Denis navrhl název fibrinogen nezávisle na Virchowovi. Nicméně trvalo dalších 20 let, než byl fibrinogen izolován. Fibrinogen poprvé izoloval Hammarsten v roce 1879 z koňské plazmy vysolením chloridem sodným (Costa-Filho et al., 2016).

Nejprve se dostal fibrinogen do centra pozornosti kvůli poznatkům, že by mohl být rizikovým faktorem kardiovaskulárního onemocnění. Teprve později se začal výzkum zaměřovat na pozitivní roli fibrinogenu jako hemostatického faktoru (Costa-Filho et al., 2016).

6.3 *Struktura fibrinogenu*

Fibrinogen je homodimerní glykoprotein s molekulovou hmotností 340 kDa (Kattula et al., 2017). Molekula fibrinogenu má podlouhlý tvar o délce 45 nm a průměru 2-5 nm (Weisel and Litvinov, 2017).

Fibrinogen se skládá ze tří párů polypeptidových řetězců označených jako $A\alpha$, $B\beta$ a γ , které jsou propojené 29 disulfidickými můstky (Kattula et al., 2017). $A\alpha$ řetězec obsahuje 610 aminokyselin, $B\beta$ obsahuje 461 aminokyselin a γ 411 aminokyselin. (Weisel, 2005). Všech šest řetězců je spojeno jejich N-konci do centrální E domény. Opačné konce řetězců $B\beta$ a γ vytváří globulární oblasti βC a γC , které lze souhrnně nazvat jako D domény. Řetězce $A\alpha$ jsou nejdelší a jejich konce se sbíhají do globulární oblasti označované jako αC (Kattula et al., 2017). Centrální doména je spojena s koncovými globulárními oblastmi pomocí α -helikálních (coiled-coil) struktur (Weisel and Litvinov, 2017).

Na každé molekule fibrinogenu jsou prostřednictvím N-glykosidických vazeb připojeny čtyři oligosacharidové řetězce. Sacharid na fibrinogenu má význam pro polymeraci fibrinu a pro strukturu koagula. Sacharidové skupiny také významně zvyšují rozpustnost fibrinogenu (Weisel and Litvinov, 2017).

Fibrinogen dále obsahuje vazebná místa pro vápenaté ionty (Ca^{2+}), které jsou důležité pro funkci fibrinogenu, polymeraci fibrinu a jeho lytickou stabilitu. Fibrinogen obsahuje vysokoafinitní vazebná místa pro Ca^{2+} označované $\beta 1$ a $\gamma 1$, podle řetězce, na kterém se nachází. Disociační konstanta pro Ca^{2+} je dostatečně vysoká, aby oba typy těchto míst byly obsazené při fyziologické koncentraci Ca^{2+} iontů. Další dvě vazebná místa pro Ca^{2+} ($\beta 2$ a $\gamma 2$) mají značně nižší afinitu. Pokud jsou vápenaté ionty navázány na vysokoafinitní místa γ řetězce, jsou tyto řetězce chráněny před enzymatickou degradací (Weisel and Litvinov, 2017).

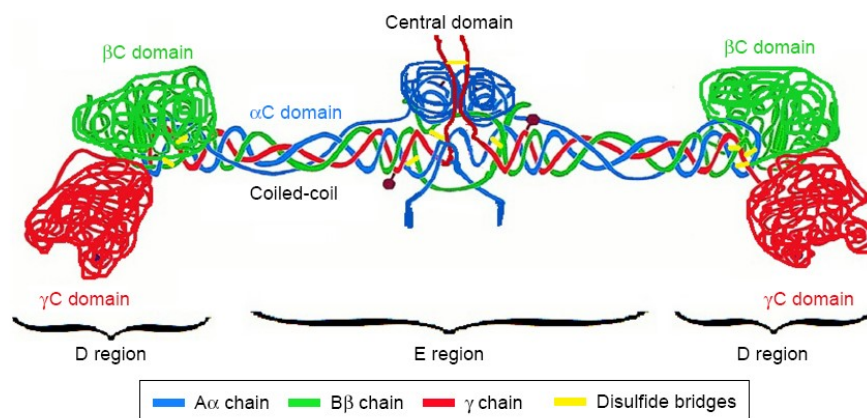


Figure 1 Fibrinogen structure. $A\alpha$ chains are shown in blue, $B\beta$ chains are shown in green, and γ chains are shown in red. Disulfide bridges stabilizing the coiled-coil regions are shown in yellow.

Obrázek 1 *Struktura fibrinogenu*

($A\alpha$ řetězce jsou modré, $B\beta$ řetězce jsou zelené a γ řetězce jsou červené, žlutou barvou jsou znázorněny disulfidické můstky) Zdroj: převzato z (Noori et al., 2017)

6.4 Syntéza a metabolismus fibrinogenu

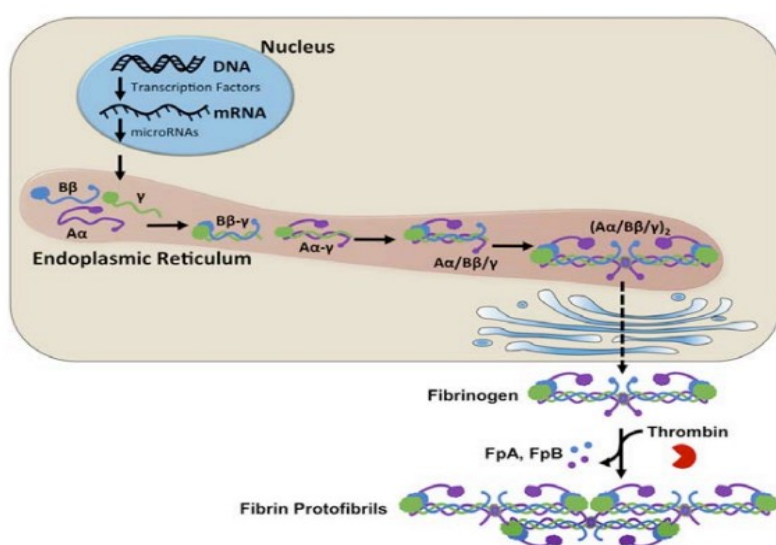
Lidský fibrinogen je produktem tří úzce spojených genů, z nichž každý specifikuje primární strukturu jednoho ze tří polypeptidových řetězců (Weisel, 2005). Geny fibrinogenu jsou lokalizovány na lidském chromozomu 4 v oblasti přibližně 50 kb. Gen kódující fibrinogenový $A\alpha$ řetězec (FGA) má velikost 7,6 kb a skládá se ze 6 exonů. Gen pro $B\beta$ řetězec (FGB) zaujímá oblast o velikosti 8 kb a představuje 8 exonů. Poslední γ řetězec (FGG) zahrnuje oblast 8,5 kb a představuje 10 exonů (Tiscia and Margaglione, 2018).

Biosyntéza fibrinogenu začíná expresí tří již zmíněných genů (FGA, FGB, FGG). Nejprve dochází v jádře hepatocytu k transkripci genů do mRNA (Surma and Banach, 2021). Následuje translace za vzniku jednotlivých fibrinogenových řetězců. Po translaci probíhá postupné sestavení fibrinogenu. Nejprve vznikají prekurzory $A\alpha/\gamma$ a $B\beta/\gamma$, poté se vytváří polomolekuly $A\alpha/B\beta/\gamma$ a nakonec hexamerní komplexy $(A\alpha/B\beta/\gamma)_2$ (Kattula et al., 2017). Jednotlivé řetězce se sestavují ve fibrinogen v hrubém endoplazmatickém retikulu v jaterních buňkách (Weisel, 2005).

Syntéza fibrinogenu je regulována transkripčními a translačními mechanismy (Kattula et al., 2017). Dále je syntéza fibrinogenu regulována IL-6, který indukuje jeho syntézu. Naopak IL-1 β a TNF- α syntézu fibrinogenu potlačují (Surma and Banach, 2021).

Játra jsou primárním zdrojem plazmatického fibrinogenu, ale je také syntetizován v extrahepatálních tkáních. Exprese γ řetězců fibrinogenu se *in vivo* prokázala i v kostní dřeni, mozku a v plicích. Je možné, že epitel plic za určitých patologických podmínek vylučuje fibrinogen a začleňuje jej do extracelulární matrix, což přispívá k fibrotickému onemocnění plic (Weisel and Litvinov, 2017).

Játra syntetizují denně 1,7-5 g fibrinogenu. Tři čtvrtiny lidského fibrinogenu jsou přítomny v plazmě, ale také je přítomen v α granulích krevních destiček, lymfě a intersticiální tekutině. Biologický poločas fibrinogenu je 3-5 dní (Weisel and Litvinov, 2017).



Obrázek 2 Syntéza fibrinogenu

Zdroj: převzato z (Kattula et al., 2017)

6.5 Funkce fibrinogenu v hemostáze

Hlavní funkcí fibrinogenu je účast na zástavě krvácení (hemostáze). Nezbytnou součástí hemostázy jsou cévy, krevní destičky, plazmatické koagulační faktory, faktory fibrinolýzy a přirozené inhibitory hemostázy. Fibrinogen je koagulační faktor označovaný římskou číslicí I (Penka and Tesařová, 2011).

Fibrinogen v hemostáze funguje jako substrát pro trombin a plazmin (Pecka, 2004). Je to rozpustná makromolekula tvořící nerozpustnou sraženinu či gel při přeměně na fibrin působením serinové proteázy trombinu, která je aktivována kaskádou enzymatických reakcí katalyzovaných poškozením cévní stěny, aktivovanými krvinkami, nebo cizím povrchem (Weisel and Litvinov, 2017). Další důležitou funkcí

fibrinogenu je tvorba primární destičkové zátky v rámci primární hemostázy. Podílí se na agregaci krevních destiček prostřednictvím vazby na jejich receptory GP IIb/IIIa (Pecka, 2004).

6.5.1 Primární hemostáza

Primární hemostáza zahrnuje interakce mezi krevními destičkami, cévní stěnou a adhezivními proteiny, které vedou k vytvoření primární hemostatické zátky (Palta et al., 2014). V místech cévního poranění dochází k odhalení subendotelu cév, ke kterému krevní destičky adherují (Broos et al., 2011). Krevní destičky jsou následně aktivovány vazbou agonistů na specifické povrchové receptory. Při aktivaci dochází u trombocytů k morfologickým změnám a k vyloučení obsahu granul exocytózou (de Queiroz et al., 2017). Aktivace destiček zahrnuje i flip-flop reakci, při které dochází k transmembránovému přesunu negativně nabitých fosfolipidů na zevní stranu membrány (Penka and Tesařová, 2011).

Na fosfolipidové povrchy se prostřednictvím kalcia váží aktivované koagulační faktory (Palta et al., 2014). V poslední fázi dochází k agregaci skrze vazbu fibrinogenu či vWF na integrin GP IIb/IIIa, která je charakterizována akumulací krevních destiček vytvářející primární hemostatickou zátku (de Queiroz et al., 2017).

6.5.2 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém zahrnuje děje vedoucí ke generaci trombinu, který je potřeba pro přeměnu fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Trombin vzniká aktivací protrombinu koagulačně aktivním komplexem – protrombinázou. Fibrin vytváří síťovitou strukturu a formuje krevní sraženinu, která funguje jako stabilní zátka podílející se na hojení ran (Pecka, 2004).

Plazmatické koagulační faktory jsou převážně glykoproteiny. Většina z nich je syntetizována v játrech a některé potřebují pro svůj vznik vitamin K. Koagulační faktory se označují římskými čísly, podle časové posloupnosti jejich objevení. Většina faktorů se v plazmě vyskytuje v podobě proenzymu a pro vznik koagulačně aktivního enzymu vyžadují proteolytické štěpení. Koagulační faktory se kaskádovitě aktivují za vzniku trombinu a následně fibrinu (Pecka, 2004).

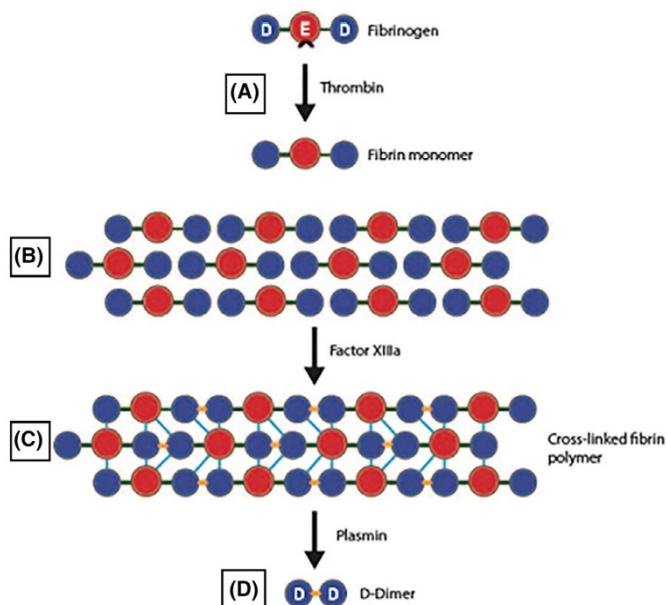
Tabulka 1 Přehled koagulačních faktorů

Faktor I	Fibrinogen
Faktor II	Protrombin
Faktor III	Tkáňový faktor (TF)
Faktor IV	Vápenaté ionty (Ca ²⁺)
Faktor V	Proakcelerin
Faktor VII	Prokonvertin
Faktor VIII	Antihemofilický faktor A
Faktor IX	Christmasův faktor
Faktor X	Faktor Stuart-Prowerové
Faktor XI	Rosenthalův faktor
Faktor XII	Hagemanův faktor
Faktor XIII	Fibrin stabilizující faktor
Prekalikrein	Fletcherův faktor
HMWK	Vysokomolekulární kininogen

Zdroj: (Pecka, 2004), vlastní zpracování

6.5.3 Přeměna fibrinogenu na fibrin

Přeměna fibrinogenu na fibrin je hlavní důsledek enzymatické kaskády koagulace krve. Probíhá ve dvou hlavních fázích. V první enzymatické fázi dochází k odštěpení fibrinopeptidů z fibrinogenu trombinem za vzniku fibrinového monomeru. Trombin je vysoce specifická serinová proteáza vznikající po aktivaci protrombinu, který je normálně přítomen v krvi. Druhá neenzymatická fáze zahrnuje samovolné sestavení fibrinových oligomerů (polymerace), které se prodlužují a vytvářejí dvouvláknové protofibrily. Protofibrily se shlukují laterálně i podélně a vytvářejí vlákna, která se větví za vzniku trojrozměrné gelové sítě. Nakonec je fibrinový polymer stabilizován faktorem XIIIa (Weisel and Litvinov, 2017).



Obrázek 3 Vznik a degradace fibrinu

(A – trombin štěpí fibrinopeptidy z E-domény fibrinogenu za vzniku fibrinového monomeru, B – polymerace fibrinových monomerů, C – zesíťovaný a stabilizovaný fibrin působením faktoru XIIIa, D – degradace stabilizovaného fibrinu na D-dimery) Zdroj: převzato z (Johnson et al., 2019)

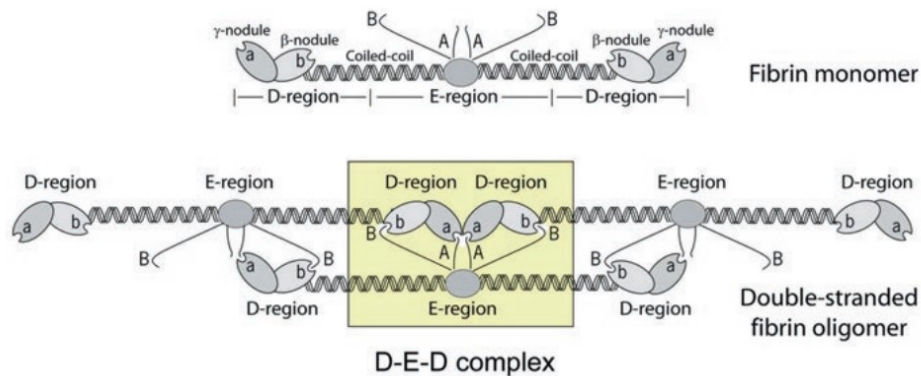
6.5.3.1 Enzymatická fáze

Z fibrinogenu jsou trombinem odštěpeny dva fibrinopeptidy A (FpA – peptid obsahující 16 aminokyselin) a dva fibrinopeptidy B (FpB – peptid obsahující 14 aminokyselin) z koncových řetězců $A\alpha$ a $B\beta$. Fibrinopeptidy A a B tvoří asi 3 % hmotnosti fibrinogenu. Uvolnění FpA je rychlejší než uvolnění FpB. Tím, že dojde k uvolnění peptidů, dochází k odkrytí vazebných míst v centrální E-doméně molekuly fibrinogenu. Vzniká tak fibrinový monomer (Pecka, 2004).

6.5.3.2 Vznik fibrinových oligomerů a protofibril

Po odštěpení FpA mají N-koncové $A\alpha$ řetězce nové aminokyselinové sekvence „A“. Během polymerace fibrinu jsou tyto sekvence komplementární s otvory „a“, které se nachází v γ nodulu v oblasti D-domény. Vznikají interakce „A-a“, které jsou vysoce specifické, stabilní a nezbytné pro polymeraci. Odštěpením FpB z $B\beta$ řetěze vzniká nová sekvence „B“ komplementární s vazebným místem „b“ nacházející se v β nodulu v oblasti D-domény. Polymerace fibrinu začíná interakcí „A-a“, která spojuje dva monomery fibrinu dohromady. Následuje podélné přidání další molekuly fibrinu za

vzniku dvouřetězcového fibrinového oligomeru. Interakce mezi dvěma řetězci jsou zprostředkovány centrální E doménou jedné molekuly fibrinu a dvou D domén dvou dalších molekul fibrinu. Vzniká komplex D-E-D. Fibrinové monomery se dále podélně přidávají k oligomerům, které se prodlužují za vzniku dvouvláknových protofibril (Weisel and Litvinov, 2017).



Obrázek 4 Fibrinový oligomer

Zdroj: převzato z (Weisel and Litvinov, 2017)

6.5.3.3 Stabilizace fibrinu faktorem XIIIa

Pro stabilizaci sraženiny proti proteolytickému a mechanickému poškození je fibrin kovalentně zesíťován plazmatickou transglutaminázou (faktorem XIIIa), který vzniká po aktivaci faktoru XIII trombinem v přítomnosti Ca^{2+} . Vazby vznikají mezi C-konci γ řetězců. Dříve byly vazby považované za příčně orientované, ale existují nové důkazy pro jejich podélnou orientaci. Před síťováním je polymerace fibrinu reverzibilní. Po zesíťování protofibril se polymerace stává nevratnou a sraženina je stabilnější, pevná, a odolnější vůči fibrinolýze (Weisel and Litvinov, 2017).

6.5.4 Fibrinolytický systém

Hlavní funkcí fibrinolytického systému je zpřístupnění a navrácení cévy do původního stavu, protože fibrinové koagulum brání krevnímu toku. Proces rozpouštění fibrinové zátky trvá za normálních okolností několik hodin. Fibrinolýza probíhá fyziologicky jen na místě, kde vznikl fibrin (Pecka, 2004). Rozpuštění fibrinové zátky zahrnuje především navázání cirkulujícího plazminogenu na fibrin a následná aktivace plazminogenu na aktivní proteázu – plazmin (Weisel, 2005). Kromě plazminu mají schopnost štěpit fibrinovou síť i jiné proteázy např. trypsin, elastázy, nebo katepsin G

(Penka et al., 2014). Plazmin štěpí fibrinové koagulum na fragmenty označované jako fibrinogen/fibrin degradační produkty (FDP) (Pecka, 2004).

6.5.4.1 Plazminogen a plazmin

Plazminogen je glykoprotein, který vzniká v játrech a je prekurzorem plazminu. V plazmě se částečně váže na glykoproteiny, které jsou bohaté na histidin. Aktivátory plazminogenu způsobí přeměnu plazminogenu na plazmin. Plazmin je proteolytický enzym s nízkou specifitou, který dokáže štěpit fibrin, fibrinogen, FII, FV, FVIII, vWF, GP Ib, GP IIb/IIIa, trombospondin. Plazmin dokáže aktivovat FVII, FXII, části komplementu a stimuluje agregaci trombocytů. Hlavní funkce plazminu ve fibrinolytickém systému je zajistit rozpuštění krevního koagula. Plazminogen je přeměněn na plazmin při vazbě t-PA a plazminogenu na fibrin. Dochází k vytvoření ternárního komplexu (t-PA.plazminogen.fibrin). Fibrin je v této reakci kofaktorem (Pecka, 2004).

6.5.4.2 Aktivátory plazminogenu

Aktivátory plazminogenu se rozdělují na vnitřní a vnější. Mezi vnitřní aktivátory plazminogenu se řadí faktor XII, prekalikren, HMWK, trombin a trypsin. Vnitřní aktivátory jsou součástí krevní plazmy na rozdíl od vnějších aktivátorů, které pocházejí z míst mimo krevní oběh. Urokináza (u-PA) a tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) jsou vnější aktivátory plazminogenu. Zdrojem u-PA jsou endotelové buňky. Zdrojem t-PA jsou buňky endotelu, aktivované monocyty a megakaryocyty (Pecka, 2004).

6.5.4.3 Štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu

Produktem štěpení fibrinogenu a rozpustného fibrinu jsou fragmenty vysokomolekulární X a Y, které se dále rozkládají na nízkomolekulární štěpy D a E. Štěpy X a Y brání polymeraci fibrinových monomerů tím, že s nimi tvoří rozpustné komplexy. Štěpy X a Y také inhibují agregaci trombocytů. Fragmenty D a E jsou odbourávány pomocí monocyto – makrofágového systému (Pecka, 2004).

6.5.4.4 Štěpení nerozpustného fibrinu

Při degradaci nerozpustného fibrinu plazminem vznikají také štěpy X a Y, které se ale od sebe neoddělují, protože obsahují kovalentní vazby. Konečným produktem štěpení nerozpustného fibrinu jsou D-dimery, které jsou složeny ze dvou D-domén fibrinových jednotek (Pecka, 2004).

6.5.4.5 D-dimery

Molekuly D-dimerů naznačují přítomnost intravaskulární koagulace, protože mohou být generovány pouze po vytvoření trombinu a následné degradaci zesíťovaného fibrinu. Z tohoto důvodu D-dimery slouží jako globální markery aktivace koagulace a fibrinolýzy a fungují jako nepřímé markery trombotické a trombolytické aktivity. Stanovení D-dimerů se používá pro diagnózu a monitorování diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a k vyloučení diagnózy žilní tromboembolie (Johnson et al., 2019).

6.5.4.6 Inhibitory koagulace a fibrinolýzy

Přirozené inhibitory koagulace a fibrinolýzy jsou složky krve, které regulují proces krevního srážení. Inhibitory krevního srážení regulují koagulaci a tím zabraňují nekontrolovatelnému srážení (Pecka, 2004).

Mezi hlavní inhibitory plazmatického koagulačního systému patří antitrombin, heparinový kofaktor II, systém proteinu C a inhibitor tkáňového faktoru. Antitrombin a heparinový kofaktor II vyvazují trombin. Systém proteinu C inaktivuje aktivované koagulační faktory VIII a V (Pecka, 2004).

Důležitými inhibitory fibrinolytického systému jsou α_2 – antiplazmin (α_2 AP), inhibitory aktivátorů plazminogenu (PAI) a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). Inhibičním principem TAFI je odštěpení C-terminálního lyzinu z fibrinu, čímž se zablokuje navázání t-PA a plazminogenu na fibrinové vlákno. Tímto mechanismem se zpomalí přeměna plazminogenu na aktivní plazmin (Penka et al., 2014). α_2 AP vyvazuje plazmin, který se vyskytuje volně v plazmě. Pokud je už plazmin navázaný na fibrin, tak ho již α_2 AP nevyváže. Dalším důležitým inhibitorem je PAI, u kterého jsou

pospány 3 typy (PAI-1, PAI-2, PAI-3), přičemž nejúčinnějším inhibitorem z nich je PAI-1, který inhibuje t-PA i u-PA (Pecka, 2004).

6.6 Metody stanovení fibrinogenu

Mezi metody stanovení fibrinogenu patří Claussova metoda, kinetické měření, kinetická turbidimetrie a imunochemické metody. Pro tyto vyšetření se odebírá nativní krev do 0,109 mol/l citrátu sodného v poměru 1:9 (1 objemový díl citrátu sodného a 9 objemových dílů nativní krve) (Pecka, 2010).

6.6.1 Claussova metoda

Principem metody podle Clausse je koagulační stanovení naředěné plazmy s přidáním trombinu v nadbytku. Claussova metoda stanovuje fibrinogen jako množství „klotabilní bílkoviny“. Důvodem pro ředění plazmy je potlačení vlivu inhibitorů koagulace. Gelační čas je úměrný koncentraci fibrinogenu při vysoké koncentraci trombinu a zároveň při nízké koncentraci fibrinogenu. Koncentrace fibrinogenu by měla být 10krát nižší než jeho koncentrace za fyziologických podmínek. Výsledek se udává v jednotkách g/l a odečítá se z kalibrační křivky. Příčinou prodloužení koagulačního času může být zvýšený výskyt FDP. Stanovení mohou ovlivňovat faktory působící v aktivním místě trombinu, nebo ty faktory, které ovlivňují polymerizaci fibrinu (Pecka, 2010).

6.6.2 Kinetické měření

Principem metody je odvození koncentrace fibrinogenu v plazmě z kinetického měření účinnosti protrombinázového komplexu (hodnoty protrombinového času). Při kinetickém měření se u optických koagulometrů používá jako „end point“ detekce nefelometrie nebo turbidimetrie. Mezi zvýšením turbidity systému a koncentrací fibrinogenu je přímá úměra. Tato metoda vykazuje dobrou korelaci s metodou podle Clausse. Metodu kinetického měření nelze použít jako náhradu Claussovy metody (Pecka, 2010).

6.6.3 Kinetická turbidimetrie

Metoda kinetické turbidimetrie je založená na použití hadího jedu – reptilázy (Batroxobin). Reptiláza umožňuje štěpení fibrinogenu na fibrin. Zákal, který vzniká ve směsi, se změní turbidimetricky při vlnové délce 330-340 nm kinetickým postupem. Koncentrace fibrinogenu se zjistí z naměřených hodnot absorbancí. Metoda kinetické turbidimetrie je přesná a má vhodný měřicí rozsah (Pecka, 2010).

6.6.4 Imunochemické testy

Imunochemické testy detekují fibrinogen, ale nejsou schopny rozlišit, zda je fibrinogen funkční nebo inaktivní. Mezi imunochemické testy patří ELISA testy (Pecka, 2010). ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) se používá obvykle ke kvantifikaci konkrétního antigenu ve vzorku. Principem této metody je vytvoření komplexu antigenu s protilátkou, která je značená enzymem, a po přidání substrátu se vytvoří barevný produkt signalizující přítomnost antigenu ve vzorku (Shah and Maghsoudlou, 2016).

6.7 Koncentrace fibrinogenu v plazmě

Fyziologická koncentrace fibrinogenu v plazmě je 1,8-4,2 g/l (SOPV 004, verze č. 10, 2021). Zvýšená koncentrace fibrinogenu se fyziologicky vyskytuje v těhotenství nebo u starších jedinců. Jelikož je fibrinogen proteinem akutní fáze, jeho hladina se zvyšuje u akutní infekce, infarktu myokardu, při cévním poškození, a po chirurgickém zákroku. Dále mohou být značně zvýšené hladiny fibrinogenu u zánětlivých a neoplastických onemocnění a trombóz. Zvýšené hodnoty bývají i u kuřáků. Naopak ke snížení hladin dochází při konzumaci některých léků, při náhlém přerušení kouření, nebo při fyzické aktivitě. Při koncentraci nižší než 0,5 g/l se u pacientů vyskytují krvácivé projevy, které jsou spojeny s afibrinogenémií a hypofibrinogenémií. Dále se snížené hladiny fibrinogenu mohou vyskytovat u dysfibrinogenémie, při diseminované intravaskulární koagulaci (DIC) a při poruchách jater (Pecka, 2010).

6.8 Afibrinogenémie, hypofibrinogenémie, dysfibrinogenémie

Vrozené poruchy fibrinogenu lze klasifikovat na kvantitativní defekty fibrinogenu (hypofibrinogenémie a afibrinogenémie), při kterých dochází ke snížení nebo vymizení

hladin, a funkční defekt molekuly fibrinogenu (dysfibrinogenémie) (de Moerloose et al., 2013). Tyto vrozené deficity mohou vznikat v důsledku mutací v genech kódujících fibrinogen (Tiscia and Margaglione, 2018). V genotypu získaných deficitů fibrinogenu se nenacházejí žádné kauzativní mutace (Casini et al., 2021).

6.8.1 Afibrinogenémie

Vrozená afibrinogenémie je autozomálně recesivní dědičná porucha charakterizovaná úplnou absencí fibrinogenu v důsledku mutací v genech kódující fibrinogen. Na základě národních a mezinárodních databází by afibrinogenémie mohla představovat až 10 % vzácných krvácivých poruch. Prevalence vrozené afibrinogenémie se odhaduje na přibližně 1 z 1 000 000. Získaný nedostatek fibrinogenu je pouze ve vzácných případech vážný natolik, aby způsobil jeho kompletní absenci (Casini et al., 2021). Afibrinogenémie je častější u žen než u mužů (de Moerloose et al., 2013).

Vzhledem k úplné nepřítomnosti fibrinogenu jsou základní koagulační testy (PT – protrombinový test, APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový test) neměřitelné. Fibrinogenová aktivita a fibrinogenový antigen jsou nezjistitelné. Aktivitu fibrinogenu lze měřit metodou podle Clausse a imunochemické testy lze použít pro stanovení fibrinogenového antigenu. Potvrzení diagnózy umožňuje genotypizace. V genotypu se nachází homozygotní nebo složené heterozygotní nulové mutace (Casini et al., 2021).

Klinický průběh afibrinogenémie může být u každého pacienta zcela odlišný. Krvácení je hlavním příznakem afibrinogenémie, ale jeho závažnost se pohybuje od život ohrožujícího krvácení do mozku až po malé a příležitostné krvácení. Pacienti trpící afibrinogenémií mají paradoxně zvýšené riziko arteriálních a žilních trombóz. Kromě těchto hlavních symptomů se pacienti mohou potýkat s defektním hojením ran, spontánní rupturou sleziny, s cystami v kostech, u žen se vyskytuje problematické těhotenství (Casini et al., 2021).

6.8.2 Hypofibrinogenémie

Hypofibrinogenémie je podobně jako afibrinogenémie autosomálně recesivně dědičná porucha (Binder et al., 2004). Prevalenci je obtížné zjistit vzhledem k vysokému počtu asymptomatických jedinců. Výskyt by měl být častější než afibrinogenémie (de Moerloose et al., 2013). Získanou hypofibrinogenémií v důsledku

snížené syntézy či zvýšené konzumpce fibrinogenu, mohou způsobit stavy jako je diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), konečné stádium onemocnění jater, užívání některých léků (fibrinolytika nebo asparagináza), nebo hadí uštknutí (Casini et al., 2021).

Koagulační testy (PT, APTT) jsou u hypofibrinogemie prodloužené v závislosti na koncentraci fibrinogenu. Dále je patrná snížená koncentrace antigenu i aktivita plazmatického fibrinogenu. V genotypu dědičné hypofibrinogemie se nachází heterozygotní nulové nebo missense mutace (Casini et al., 2021).

Pacienti jsou většinou asymptomatictí. U žen s hypofibrinogemií se mohou vyskytnout komplikace spojené s těhotenstvím např. poporodní krvácení, spontánní potrat. Onemocnění jater se u pacientů s hypofibrinogemií vyskytuje velmi vzácně (de Moerloose et al., 2013).

6.8.3 Dysfibrinogemie

Dysfibrinogemie je autozomálně dominantní dědičná porucha charakterizovaná sníženou funkční aktivitou fibrinogenu v důsledku mutací genu kódujícího fibrinogen. Prevalenci je obtížné zjistit vzhledem k vysokému počtu asymptomatických jedinců. Výskyt dysfibrinogemie je častější než výskyt afibrinogemie a hypofibrinogemie (de Moerloose et al., 2013). Dysfibrinogemie vzniká i sekundárně často při jaterních poruchách (Binder et al., 2004).

Koagulační testy (PT, APTT) jsou prodloužené (Casini et al., 2021). Prodloužený je také trombinový test, který je nejcitlivější pro záchyt dysfibrinogemie. Patologické hodnoty vykazuje i reptilázový test (Binder et al., 2004). Aktivita fibrinogenu je snížena, ale fibrinogenový antigen vykazuje normální hodnoty. V genotypu se u vrozené dysfibrinogemie nachází heterozygotní missense mutace (Casini et al., 2021).

U 40-55 % pacientů s dysfibrinogemií je průběh onemocnění bez symptomů. U 25-50 % pacientů může docházet k lehkému krvácení v souvislosti s chirurgickými zákroky. Méně často dochází ke spontánnímu krvácení (např. epistaxe). 10-20 % pacientů s dysfibrinogemií má zvýšené sklony k arteriální a venózní trombóze či spontánním potratům u těhotných žen (Binder et al., 2004).

6.8.4 Léčba krevními deriváty

Krevní deriváty obsahující fibrinogen se používají pro léčbu vrozené afibrinogenemie, hypofibrinogenemie a dysfibrinogenemie. Krevní deriváty s obsahem fibrinogenu jsou také indikovány u získané hypofibrinogenemie, která vzniká jako důsledek poškození jaterního parenchymu, nebo také při zvýšené spotřebě při diseminované intravaskulární koagulaci. Krevní deriváty lze získat buď frakcionací lidské plazmy, nebo rekombinantními technikami (Penka and Tesařová, 2012).

Před podáním fibrinogenu se musí zjistit hladina fibrinogenu metodou podle Claussa. Počet aplikací a množství podaných jednotek závisí na klinickém stavu pacienta a na jeho hmotnosti. Kritická koncentrace fibrinogenu v plazmě, která ohrožuje pacienta krvácením v důsledku jeho nedostatku, je 1g/l (Penka and Tesařová, 2012).

7. PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část bakalářská práce se zabývá zavedením nové reagentie pro stanovení koncentrace fibrinogenu do laboratorní praxe. Aby se nová reagentie STA-Liquid Fib mohla zavést do provozu laboratoře, musí být porovnána s původně používanou reagentií DG-FIB L Human. Naměřené hodnoty koncentrací fibrinogenu u vzorků pacientů s oběma reagentiemi byly statisticky vyhodnoceny za účelem prokázání míry jejich shody.

7.1 *Vyšetřovaný materiál*

Pro vyšetření fibrinogenu je nutné odebrat žilní krev do umělohmotné zkumavky s antikoagulačním činidlem. Jako antikoagulační činidlo se používá 0,109 mol/l (3,2 %) citrát sodný. Je nezbytné dodržet správný poměr krve a citrátu sodného ve zkumavce. Do zkumavky obsahující 1 díl 0,109 mol/l citrátu sodného se dnes zpravidla pomocí vakuového systému odebere 9 dílů krve. Odebraný vzorek musí být nejdéle do dvou hodin od jeho odběru transportován do laboratoře. Materiál by se měl během jeho dopravy do laboratoře uchovávat při teplotě 15-25 °C. Při příjmu vzorku laboratoří se vzorek identifikuje, zaeviduje do laboratorního informačního systému (LIS), a přidělí se mu identifikační číslo. Před vlastní analýzou přístrojem se vzorek citrátové krve centrifuguje 10 minut při 3500 ot. /min, čímž získáme plazmu chudou na destičky, potřebnou pro vyšetření (Pecka, 2010; SOPV 004, verze č. 10, 2021; SOPV 004, verze č. 9, 2017).

7.2 *Automatický koagulometr STA-R Evolution*

Automatický koagulometr STA-R Evolution od firmy Diagnostica Stago, který je umístěn v laboratoři IV. interní hematologické kliniky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, byl použit k vyšetření vzorků pacientů. Přístroj se používá k měření koagulačních testů nebo testů na principu spektrofotometrie a imunoturbidimetrie (SOPT 010, verze 03, 2017).

Koagulační testy fungují na principu měření změny pohybu kovové kuličky v magnetickém poli. Fibrinová vlákna, vznikající při koagulačním ději, zapříčiňují zvýšení viskozity v měřeném systému a zpomalení kovové kuličky umístěné v kyvetě.

Na tomto principu umožňuje automatický koagulometr STA-R provádět základní koagulační testy (PT, APTT, TT, fibrinogen) i řadu speciálních testů (např. aktivity koagulačních faktorů atd.) (SOPT 010, verze 03, 2017).

Principem spektrofotometrických testů je měření změny absorbance po průchodu monochromatického světla vzorkem při vlnové délce 405 nm. Tato detekce je využívána při stanovení např. antitrombinu a anti-Xa aktivity (SOPT 010, verze 03, 2017).

Imunoturbidimetrické testy využívají k detekci měření změny absorbance po průchodu monochromatického světla vzorkem při vlnové délce 540 nm. Imunoturbidimetricky se stanovují např. D-dimery (SOPT 010, verze 03, 2017).

Přístroj obsahuje 220 pozic pro vzorky pacientů, 75 pozic pro reagenty a zásobník pro 1000 měřících kyvet. Přístroj dále disponuje čtečkou čárových kódů. Vnitřní prostor přístroje lze rozdělit na 3 části – zásobníky se zkumavkami, prostor pro reagenty, část s inkubačními a měřícími jamkami. Prostor pro reagenty je vytemperován na 15-19 °C a rozdělen na 3 části (R0, R1, R2). Část R0 je určena pro vkládání kalibrační plazmy, kontrolní plazmy a ředících roztoků. Část R1 je určena pro reagenty, které se pipetují před inkubací. Část R2 je určena pro startovací reagenty. K přístroji jsou dále připojena přídatná zařízení (dotykový monitor, myš, klávesnice, laserová tiskárna) (SOPT 010, verze 03, 2017).



Obrázek 5 Automatický koagulometr STA-R-Evolution

Zdroj: vlastní pořizené fotografie

7.3 Princip metody stanovení fibrinogenu

Stanovení koncentrace fibrinogenu se provádí koagulační metodou podle Clausse. Vyšetřovaným materiálem je plazma, která je zředěná a inkubována s nadbytkem trombinu. Důvodem pro zředěním plazmy je potlačení vlivu koagulačních inhibitorů. V tomto systému se měří koagulační čas (čas do vytvoření fibrinového vlákna), který je závislý na koncentraci fibrinogenu (SOPV 004, verze č. 9, 2017; SOPV 004, verze č. 10, 2021).

7.4 Použité reagensie

Pro stanovení fibrinogenu byly použity reagensie DG-FIB L Human a STA-Liquid Fib.

Tabulka 2 Použité reagensie

Název	DG-FIB L Human	STA-Liquid Fib
Výrobce	Grifols	Stago
Šarže	20001.01	256393
Exspirace	07/2021	04/2022
Balení	3 x 5 ml	12 x 4 ml

Zdroj: Příbalový leták STA-Liquid Fib a DG-FIB L Human

7.4.1 Reagensie DG-FIB L Human

DG-FIB L Human je reagensie vyrobená firmou Grifols a obsahuje lidský trombin (50 IU/ml) v pufovaném roztoku, chlorid vápenatý, stabilizátory a konzervační látky. Reagensie je tekutá, před použitím se pouze promíchá překlopením lahvičky a vytemperuje na laboratorní teplotu (SOPV 004, verze č. 9, 2017).

7.4.2 Reagensie STA-Liquid Fib

STA-Liquid Fib je reagensie vyrobená firmou Diagnostica Stago a obsahuje lidský trombin (100 NIH/ml) v pufovaném roztoku, chlorid vápenatý, stabilizátory, konzervační látky a specifický inhibitor heparinu. Inhibitor heparinu umožňuje stanovení fibrinogenu i v heparinované plazmě. Reagensie je tekutá, před použitím se pouze promíchá překlopením lahvičky a vytemperuje na laboratorní teplotu (SOPV 004, verze č. 10, 2021; Příbalový leták STA-Liquid Fib).

Obě reagensie se používají ke kvantitativnímu stanovení fibrinogenu v citrátové lidské plazmě metodou podle Clauss. (SOPV 004, verze č. 9, 2017; SOPV 004, verze č. 10, 2021).

Tabulka 3 Stabilita reagensů (DG-FIB L Human a STA Liquid Fib)

Reagencie	Teplota (°C)	Doba stability
Neotevřený DG-FIB L Human	2-8	do expirace
Otevřený DG-FIB L Human	15-19	4 dny
	2-8	6 měsíců
Neotevřený STA-Liquid Fib	2-8	do expirace
Otevřený STA-Liquid Fib	15-19	10 dní
	2-8	2 měsíce

Zdroj: (SOPV 004, verze č. 9, 2017; SOPV 004, verze č. 10, 2021), vlastní zpracování

7.5 Nastavení přístroje

Tabulka 4 Nastavení koagulometru

Nastavení koagulometru	DG-FIB L Human (Grifols)	STA-Liquid Fib (Stago)
Vyšetřovaná plazma	100µl	150µl
Ředění puřrem	1/10	1/20
Inkubace 37 °C	240 s	240 s
Reagencie	50µl	50µl

Zdroj: (SOPV 004, verze č. 9, 2017; SOPV 004, verze č. 10, 2021), vlastní zpracování

Vyšetřovaná plazma se automaticky ředí v přístroji Owren-Kollerovým puřrem.

7.6 Kalibrace metod

Cílem analytické kalibrace je definovat vztah, který umožňuje vypočítat množství látky ve vzorku (na ose x) z naměřených hodnot (analytického signálu) přístrojem (na ose y) (Cuadros-Rodríguez et al., 2007). Koagulometr při stanovení fibrinogenu měří gelační čas a výsledek se udává v jednotkách g/l, a proto je kalibrační křivka potřebná pro určení koncentrace fibrinogenu.

V případě metody stanovení fibrinogenu s použitím reagensie DG-FIB L Human se provádí kalibrace metody pomocí kalibrační plazmy (STA Unicalibrator), která má

deklarovanou hodnotu fibrinogenu. Koagulometr si vytvoří kalibrační křivku automaticky. Sám si naředí kalibrační plazmu na jednotlivé body kalibrační křivky. Kalibračních bodů je 5. Kalibrační plazma se ředí 1/6, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50. Obě osy (x, y) kalibrační křivky jsou logaritmické a závislost grafu je lineární (SOPV 004, verze č. 9, 2017).

STA Unicalibrator je reagencie od firmy Diagnostica Stago potřebná pro kalibraci. Obsahuje lyofilizovanou kalibrační plazmu, která se před použitím naředí 1 ml vody pro injekce. Poté se nechá stát 30 minut při laboratorní teplotě, a nakonec se jemně promíchá (SOPV 004, verze č. 9, 2017).

Tabulka 5 Stabilita reaglií pro kalibraci

Reagencie	Teplota (°C)	Doba stability
Lyofilizovaný Unicalibrator	2-8	do expirace
Naředěný Unicalibrator	15-19	4 hodiny

Zdroj: (SOPV 004, verze č. 9, 2017), vlastní zpracování

V případě metody stanovení fibrinogenu s použitím reagliie STA Liquid Fib, je reagliie výrobcem předkalibrována. Na příbalovém letáku se pro danou šarži nachází čárový kód, který je nezbytný pro načtení kalibrační křivky do přístroje (SOPV 004, verze č. 10, 2021).

Sekundární standard pro kalibraci nové metody má návaznost na mezinárodní standard 09/264, který byl zavedený v roce 2011 (Příbalový leták STA-Liquid Fib). STA Unicalibrator by měl mít podle výrobce návaznost na stejný mezinárodní standard 09/264.

7.7 Kontrola kvality

Kontrola kvality je nutná pro zajištění spolehlivých výsledků a zahrnuje kontrolu mezilehlé preciznosti a přesnosti měření. Každý den je potřeba před zahájením provozu provést kontrolní měření k ověření funkčnosti přístroje a kontrole stavu reaglií. Toho

je docíleno změřením komerčních kontrolních plazem, normální a patologické. Kontrola preciznosti se provádí na přístroji jednou denně. Ke kontrole preciznosti se využívá normální a patologická neatestovaná kontrolní plazma. Po kalibraci či načtení kalibrační křivky se provede kontrola přesnosti s atestovanými kontrolními plazmami, které mají deklarované rozmezí hodnot. Kontrola přesnosti se provádí také pravidelně 1x měsíčně. Pokud by přístroj naměřil u kontrolních plazem hodnoty mimo deklarované rozmezí, spustil by alarm a vyšetřovat pacientské vzorky by nebylo možné (SOPV 004, verze č. 9, 2017; SOPV 004, verze č. 10, 2021)

7.7.1 Reagencie pro kontrolu mezilehlé preciznosti

MRX 171 OEM a MRX 172 OEM (Medirox) jsou reagencie používané pro kontrolu mezilehlé preciznosti. Kromě stanovení fibrinogenu se používají k posouzení mezilehlé preciznosti i u dalších koagulačních analýz (PT, APTT, Antitrombin, D-dimery). MRX 171 OEM se používá ke kontrole kvality koagulačních testů v normálním rozsahu a MRX 172 OEM v patologickém rozsahu. Před použitím se každá lahvička rozpustí s 1 ml destilované nebo deionizované vody, která by měla mít teplotu 15-25 °C. Lahvička se nechá stát po dobu 15-30 minut, a nakonec se obsah jemně promíchá (Příbalový leták MRX 171 OEM a MRX 172 OEM)

Tabulka 6 Stabilita reagentů pro kontrolu mezilehlé preciznosti

Reagencie	Teplota (°C)	Doba stability
Lyofilizované MRX 171 OEM a MRX 172 OEM	2-8	do expirace
Nañeděné MRX 171 OEM a MRX 172 OEM a určené pro stanovení fibrinogenu	2-25	54 hodin

Zdroj: (Příbalový leták MRX 171 OEM a MRX 172 OEM), vlastní zpracování

7.7.2 Reagencie pro kontrolu přesnosti

STA Coag Control N+P jsou reagencie pro kontrolu přesnosti od firmy Diagnostica Stago. Před použitím se obsah lahviček naředí 1 ml vody pro injekce. Poté se nechají stát 30 minut při laboratorní teplotě, a nakonec se jemně promíchají (SOPV 004, verze č. 9, 2017; SOPV 004, verze č. 10, 2021).

Tabulka 7 Stabilita reagensů pro kontrolu přesnosti

Reagencie	Teplota (°C)	Doba stability
Lyofilizovaná Coag Control N+P	2-8	do expirace
Naředěná Coag Control N+P	15-19	8 hodin

Zdroj: (SOPV 004, verze č. 9, 2017; SOPV 004, verze č. 10, 2021), vlastní zpracování

7.8 Pracovní postup

1) Jako první jsem si připravila potřebné reagencie na stanovení fibrinogenu (DG-FIB L Human a STA Liquid Fib), dále roztok Owren-Kollerova pufru, kalibrační plazmu (STA Unicalibrator), kontrolní plazmy (MRX 171 OEM, MRX 172 OEM, Coag Control N+P). Podle návodu jsem reagencie připravila naředěním a promícháním (STA Unicalibrator, MRX 171 OEM, MRX 172 OEM, Coag Control N+P). Ostatní reagencie (DG-FIB L Human, STA Liquid Fib, Owren-Kollerův pufr) jsou tekuté a stačí je pouze vytemperovat na laboratorní teplotu a promíchat.

2) Připravené reagencie jsem vložila do koagulometru. Kalibrační plazma, kontrolní plazmy, reagencie STA Liquid Fib a Owren-Kollerův pufr se načtou do přístroje pomocí čárových kódů na lahvičkách. Reagencie DG-FIB L Human se zadává do přístroje ručně včetně ID a šarže reagencie (stabilita a ostatní údaje o reagentu se automaticky zobrazí)

3) Všechny reagencie jsem vložila do vyhrazených míst reagenční zásuvky. Do R0 jsem vložila kalibrační plazmu, kontrolní plazmy, pufr a do R2 porovnávané reagencie (DG-FIB L Human a STA Liquid Fib)

4) Před vlastním stanovením fibrinogenu jsem provedla kalibraci u metody s reagentem DG-FIB L Human. U metody s reagentem STA Liquid Fib jsem načetla do koagulometru kalibrační křivku pomocí čárového kódu.

5) Po kalibraci jsem spustila kontrolu přesnosti s atestovanými kontrolními plazmami Coag control N+P. Každý další den měření jsem změřila kontrolu pro mezilehlou preciznost (MRX 171 OEM, MRX 172 OEM).

- 6) Po správně proběhlé kontrole kvality jsem připravila vzorky. Jednalo se o vzorky pacientů FN Hradec Králové. Měření vzorků proběhlo v rámci jednoho týdne. Pro stanovení fibrinogenu jsem každý den dostala k vyšetření připravené vzorky. Tyto vzorky se po příjmu zadali do LISu a byly centrifugovány při 3500 ot./min. po dobu 10 min.
- 7) Zkumavky se vzorky jsem vložila do přístroje do zásobníku na zkumavky. Přístroj si načte čárové kódy zabudovanou čtečkou a podle požadavků zadaných v LISu zjistí, jaké testy má u daných pacientů měřit. Poté je koagulometr začal automaticky měřit.
- 8) Přístroj po dokončení měření automaticky vytisknul výsledky. Výsledky přejdou automaticky do LISu. Naměřené hodnoty jsem zpracovala do tabulky.
- 9) V posledním kroku jsem výsledky statisticky vyhodnotila. Pro statistické vyhodnocení naměřených hodnot jsem zvolila metodu lineární regrese a Bland – Altmanův graf.

7.9 Výsledky a jejich statistické vyhodnocení

Změřila jsem koncentraci fibrinogenu u 71 pacientů. Výsledky jsem zpracovala do tabulky č. 8. Každý patientský vzorek byl změřen současně původní (DG-FIB L Human) a novou (STA-Liquid Fib) reagenti s cílem zjistit, jak dobře spolu metody korelují a jakou mají mezi sebou shodu. Výsledky měření jsem statisticky vyhodnotila metodou lineární regrese (korelačním grafem) a pomocí Bland – Altmanova grafu. Pro tvorbu grafů jsem použila program Microsoft Excel.

Důvodem statistického vyhodnocení těchto dvou metod je zajištění spolehlivosti výsledků porovnáním rozdílů v původní a nové metodě. Porovnání metod je nezbytnou součástí při zavedení nové metody do provozu laboratoře (Giavarina, 2015).

Korelační graf porovnává výsledky měření stanovení koncentrace fibrinogenu za použití dvou různých reagentů – původně používané DG-FIB L Human (na ose x) a nové STA-Liquid Fib (na ose y). Lineární vztah mezi oběma metodami udává hodnota korelačního koeficientu (r), jehož číselná hodnota se pohybuje od -1,0 do +1,0. Čím blíže se hodnota r blíží těmto hodnotám, tím více vykazují metody silnější korelaci. Výstupem grafu je kromě r také rovnice regresní přímky, která je zásadní pro porovnání

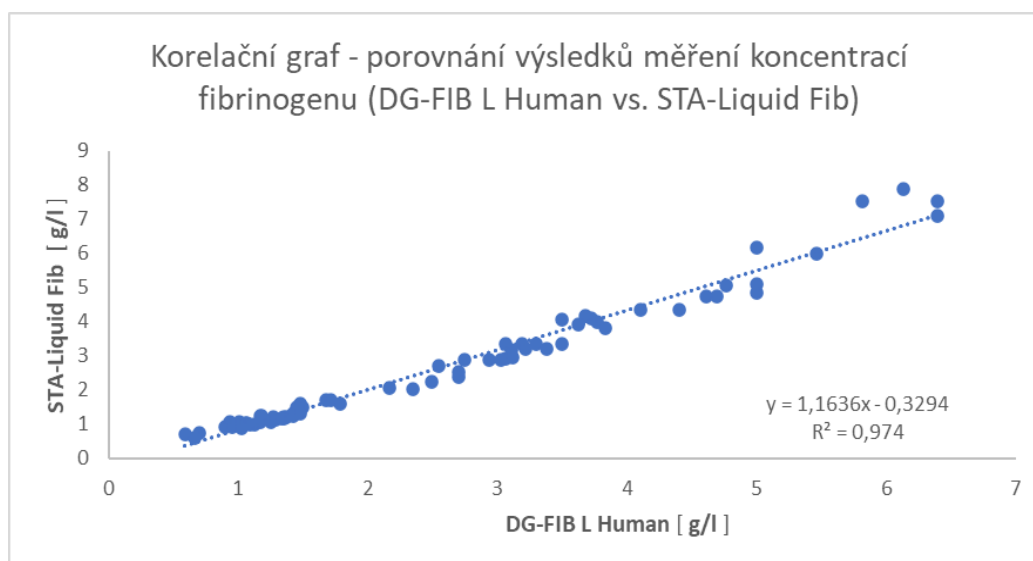
metod. Dvě metody navržené pro měření stejné proměnné, by měli mít dobrou korelaci (Giavarina, 2015).

Bland-Altmanův graf porovnává shodu mezi výsledky, které byly naměřené reagensy DG-FIB L Human a STA_Liquid Fib. Tento graf je určen k popisu shody mezi dvěma kvantitativními měřeními pomocí sestavení limitů shody. Tyto statistické limity se vypočítají pomocí průměru a směrodatné odchylky (SD) rozdílů hodnot mezi výsledky naměřenými oběma metodami. Výsledkem je bodový graf, ve kterém osa y udává rozdíl mezi výsledky naměřenými oběma metodami a osa x představuje průměr těchto měření. 95 % datových bodů by mělo ležet v rozmezí $\pm 1,96SD$ od průměru rozdílů hodnot (Giavarina, 2015). Při dobré shodě metod datové body leží relativně blízko přímky, která představuje průměr rozdílů hodnot. Dalším parametrem, který určuje míru shody metod jsou limity shody, které by se měli blížit nule (Doğan, 2018).

7.9.1 Hodnocení grafů

Korelační závislost výsledků naměřených reagensy DG-FIB L Human a STA Liquid Fib jsem vyjádřila pomocí rovnice přímky a hodnoty korelačního koeficientu. Korelační graf zobrazuje regresní přímku. Hodnoty byly do grafu zadávány v jednotkách g/l. Rovnice přímky pro stanovení koncentrace fibrinogenu oběma reagensy je ($y = 1,1636x - 0,3294$; $R^2 = 0,974$) a korelační koeficient ($r = 0,9869$). Hodnota korelačního koeficientu, která se pohybuje v těsné blízkosti hodnoty 1, poukazuje na těsnou korelaci výsledků naměřených reagensy DG-FIB L Human a STA Liquid Fib.

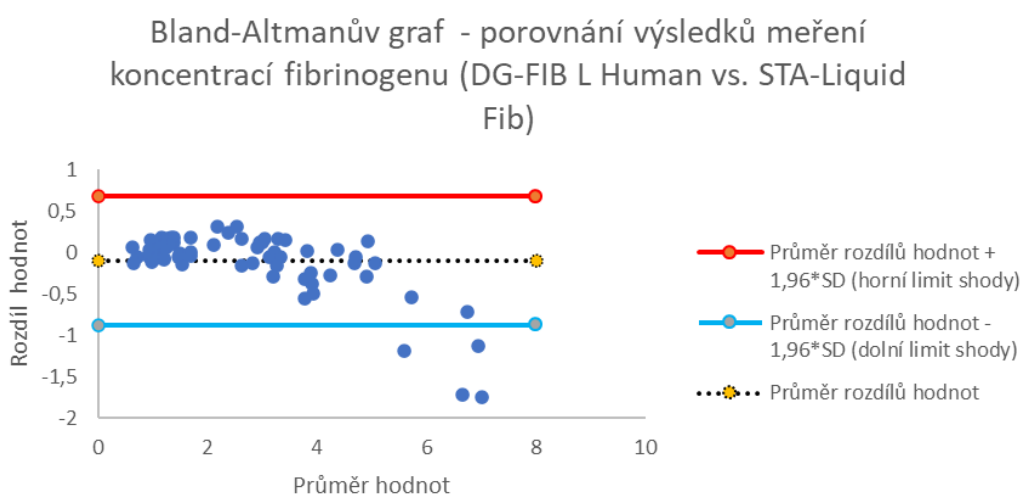
Graf 1 Korelační graf – porovnání výsledků měření koncentrací fibrinogenu



Zdroj: vlastní zpracování

Bland-Altmanův graf potvrzuje velmi dobrou shodu mezi výsledky naměřenými oběma reagensy. Limity shody se na ose y pohybují v poměrně úzkém intervalu -0,8 do +0,6. Průměr rozdílů hodnot se nachází na hodnotě -0,09. Datové body leží relativně blízko přímky průměru rozdílů hodnot a 94,3 % z nich leží v rozmezí $\pm 1,96SD$ od této přímky.

Graf 2 Bland-Altmanův graf – porovnání výsledků měření koncentrací fibrinogenu



Zdroj: vlastní zpracování

8. DISKUSE

Fibrinogen se v současné době stanovuje nejčastěji na automatických koagulometrech koagulační metodou dle Clause, což je funkční test, který hodnotí schopnost přeměny fibrinogenu na fibrin. Reagencie potřebné pro toto stanovení obsahují jako hlavní činidlo trombin a vápenaté ionty.

V dnešní době se používají reagenty, které jsou komerčně vyráběné s CE značkou. Výroba těchto komerčních kitů podléhá striktním výrobním postupům, které zajišťují výrobu reagentů o potřebné kvalitě. I přesto je nezbytné, aby si každá laboratoř provedla před zavedením nové reagenty do provozu srovnávací studii, která porovná dosud používanou reagentu s reagentu nově zaváděnou.

V této srovnávací studii jsme porovnávali naměřené hodnoty koncentrací fibrinogenu v plazmě s využitím dvou reagentů (DG-FIB L Human a STA-Liquid Fib) od dvou různých výrobců (Grifols a Stago). Měření oběma metodami proběhlo současně na každém vzorku. Celkem jsme změřili 71 patientských vzorků.

Výsledky jsme vyhodnotili metodou lineární regrese a také Bland-Altmanovým grafem. Korelaci jsme vyjádřili rovnicí regresní přímky ($y = 1,1636x - 0,3294$) a korelačním koeficientem ($r = 0,9869$). Rovnice regresní přímky a korelační koeficient vypovídají o velmi dobré korelaci obou metod.

Bland-Altmanův graf ukazuje na dobrou shodu porovnávaných výsledků, o které nás informuje úzký interval limitů shody (-0,8 do +0,6), hodnota průměru rozdílu hodnot (-0,09) a také rozdělení datových bodů v rozmezí $\pm 1,96SD$ (94,3 %). Z Bland-Altmanova grafu je patrné, že obecně naměřené vysoké hodnoty koncentrace fibrinogenu leží v grafu mimo stanovené rozmezí $\pm 1,96SD$. Dalo by se tedy říct, že pokud bychom k měření měli k dispozici více vzorků s vyššími koncentracemi fibrinogenu, mohlo by více datových bodů ležet mimo stanovené rozmezí. Nová reagenty STA-Liquid Fib poskytuje v těchto vysokých koncentracích vyšší naměřené hodnoty než původní reagenty. Pro potřeby laboratoře je procento datových bodů ležících v rozmezí $\pm 1,96SD$ v naší studii dostačující pro zavedení nové reagenty do provozu laboratoře. Výraznější rozdíly vysokých koncentrací fibrinogenu nemají zásadní klinický význam.

Výhodou nově zaváděné reagencie (STA-Liquid Fib) na rozdíl od původně používané (DG-FIB L Human) je širší validovaný měřicí rozsah konkrétně 0,4-12 g/l. I přes větší rozsah měření u STA-Liquid Fib jsou nízké hodnoty pod 1,0 g/l přeměřovány nižším ředěním 1/8 a naopak vyšší hodnoty nad 8,0 g/l jsou přeměřovány vyšším ředěním 1/40. Z toho by se dalo usuzovat, že bude tato nová metoda měřit zejména v oblasti nízkých a vysokých koncentrací fibrinogenu přesněji, protože původní metoda přeměřování s jiným ředěním vzorku nastavené neměla. Navíc byl u původní metody využívající reagencii DG-FIB L Human validovaný měřicí rozsah pouze v rozmezí 0,5-6 g/l. Mezi výhody nové metody s použitím STA-Liquid Fib bych také uvedla, že se jedná o předkalibrovanou reagencii, a tudíž odpadá potřeba provedení kalibrace v případě nové šarže. Výhodou je také u STA-Liquid Fib delší stabilita v přístroji.

Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že obě reagencie pro stanovení koncentrace fibrinogenu měří se srovnatelnou přesností.

9. ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce jsem popsala fibrinogen, jeho strukturu, syntézu, a úlohu v hemostáze. Také jsem popsala možnosti stanovení a patofyziologii fibrinogenu.

V praktické části jsem provedla srovnávací studii dvou reagensií, které se používají pro stanovení koncentrace fibrinogenu (původně používaná DG-FIB L Human a nová STA-Liquid Fib) za účelem prokázání jejich shody v měření. Provedení této srovnávací studie je standardním postupem, jak zavést novou reagensii do provozu hematologické laboratoře.

Výsledky měření byly vyhodnoceny metodou lineární regrese a vyneseny do korelačního grafu, dále byly hodnoceny pomocí Bland-Altmanova grafu. Statistickým vyhodnocením výsledků jsme došli k závěru, že metody používající původní i novou reagensii mají mezi sebou dobrou shodu. Rozdíly mezi naměřenými hodnotami jsou ve většině případů z klinického pohledu prakticky zanedbatelné, což vypovídá o tom, že obě reagensie měří koncentraci fibrinogenu se srovnatelnou přesností. Nová reagensie STA-Liquid Fib může nahradit původně používanou DG-FIB L Human.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
α_2 AP	α_2 – antiplazmin
Ca^{2+}	vápenaté ionty
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
FDP	fibrinogen/fibrin degradační produkty
FGA	gen kódující fibrinogenový A α řetězec
FGB	gen kódující fibrinogenový B β řetězec
FGG	gen kódující fibrinogenový γ řetězec
FpA	fibrinopeptid A
FpB	fibrinopeptid B
FII	faktor II protrombin
FV	faktor V proakcelerin
FVIII	faktor VIII antihemofilický faktor A
FXII	faktor XII Hagemanův faktor
FXIII, FXIIIa	faktor XIII faktor stabilizující fibrin a jeho aktivovaná forma
GP	glykoproteiny
GP IIb/IIIa	glykoproteinový komplex IIb/IIIa
HMWK	vysokomolekulární kininogen
IL-6	interleukin - 6
LIS	laboratorní informační systém
PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PAI – 1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PAI – 2	inhibitor aktivátoru plazminogenu 2

PAI – 3	inhibitor aktivátoru plazminogenu 3
PT	protrombinový test
r	korelační koeficient
R ²	hodnota spolehlivosti
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TT	Trombinový test
u-PA	urokinázový aktivátor plazminogenu
vWF	von Willebrandův faktor

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled koagulačních faktorů	15
Tabulka 2 Použité reagensie	28
Tabulka 3 Stabilita reagensií (DG-FIB L Human a STA Liquid Fib).....	29
Tabulka 4 Nastavení koagulometru	29
Tabulka 5 Stabilita reagensií pro kalibraci	30
Tabulka 6 Stabilita reagensií pro kontrolu mezilehlé preciznosti	31
Tabulka 7 Stabilita reagensií pro kontrolu přesnosti	32
Tabulka 8 Naměřené hodnoty koncentrace fibrinogenu u pacientů	45

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura fibrinogenu	12
Obrázek 2 Syntéza fibrinogenu.....	13
Obrázek 3 Vznik a degradace fibrinu	16
Obrázek 4 Fibrinový oligomer.....	17
Obrázek 5 Automatický koagulometr STA-R-Evolution	27

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Korelační graf – porovnání výsledků měření koncentrací fibrinogenu.....	35
Graf 2 Bland-Altmanův graf – porovnání výsledků měření koncentrací fibrinogenu....	35

14. POUŽITÁ LEITERATURA

BINDER, Tomáš, Petr SALAJ a Blanka VAVŘINKOVÁ. *Hematologické nemoci a poruchy v porodnictví a gynekologii*. V Praze: Triton, 2004. ISBN 80-7254-540-X

BROOS, Katleen, Hendrik B. FEYS, Simon F. DE MEYER, Karen VANHOORELBEKE a Hans DECKMYN. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews* [online]. 2011, 25(4), 155-167 [cit. 2022-08-01]. ISSN 0268960X. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2011.03.002

CASINI, Alessandro, Marguerite NEERMAN-ARBEZ a Philippe DE MOERLOOSE. Heterogeneity of congenital afibrinogenemia, from epidemiology to clinical consequences and management. *Blood Reviews* [online]. 2021, 48 [cit. 2022-08-01]. ISSN 0268960X. Dostupné z: doi:10.1016/j.blre.2020.100793

COSTA-FILHO, Rubens, Gerald HOCHLEITNER, Michael WENDT, Alexandre TERUYA a Donat R. SPAHN. Over 50 Years of Fibrinogen Concentrate. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* [online]. 2016, 22(2), 109-114 [cit. 2022-08-01]. ISSN 1076-0296. Dostupné z: doi:10.1177/1076029615601494

CUADROS-RODRÍGUEZ, Luis, M. Gracia BAGUR-GONZÁLEZ, Mercedes SÁNCHEZ-VIÑAS, Antonio GONZÁLEZ-CASADO a Antonio M. GÓMEZ-SÁEZ. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1158(1-2), 33-46 [cit. 2022-08-01]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.03.030

DE MOERLOOSE, Philippe, Alessandro CASINI a Marguerite NEERMAN-ARBEZ. Congenital Fibrinogen Disorders: An Update. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2013, 39(06), 585-595 [cit. 2022-08-01]. ISSN 0094-6176. Dostupné z: doi:10.1055/s-0033-1349222

DE QUEIROZ, Mayara Ribeiro, Bruna Barbosa DE SOUSA, Déborah Fernanda DA CUNHA PEREIRA, Carla Cristine Neves MAMEDE, Mariana Santos MATIAS, Nadia Cristina Gomes DE MORAIS, Júnia DE OLIVEIRA COSTA a Fábio DE OLIVEIRA. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon* [online]. 2017, 133, 33-47 [cit. 2022-08-01]. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2017.04.013

DOĞAN, Nurettin Özgür. Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agreement. *Turkish Journal of Emergency Medicine* [online]. 2018, 18(4), 139-141 [cit. 2022-08-01]. ISSN 24522473. Dostupné z: doi:10.1016/j.tjem.2018.09.001

GIAVARINA, Davide. Understanding Bland Altman analysis. *Biochimica Medica* [online]. 2015, 25(2), 141-151 [cit. 2022-08-01]. ISSN 18467482. Dostupné z: doi:10.11613/BM.2015.015

JOHNSON, Eric D., John C. SCHELL a George M. RODGERS. The D-dimer assay. *American Journal of Hematology* [online]. 2019 [cit. 2022-08-01]. ISSN 0361-8609. Dostupné z: doi:10.1002/ajh.25482

KATTULA, Sravya, James R. BYRNES a Alisa S. WOLBERG. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2017, 37(3) [cit. 2022-08-01]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.117.308564

NOORI, Alireza, Seyed Jamal ASHRAFI, Roza VAEZ-GHAEMI, Ashraf HATAMIAN-ZAREMI a Thomas J WEBSTER. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2017, 12, 4937-4961 [cit. 2022-08-01]. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S124671

PALTA, Sanjeev, Richa SAROA a Anshu PALTA. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia* [online]. 2014, 58(5) [cit. 2022-08-01]. ISSN 0019-5049. Dostupné z: doi:10.4103/0019-5049.144643

PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010. ISBN 978-80-903871-9-5.

PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-86682-03-X

PENKA, Miroslav, Igor PENKA a Jaromír GUMULEC. *Krvácení*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-0689-4.

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.

PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0

Příbalový leták DG-FIB L Human

Příbalový leták MRX 171 OEM a MRX 172 OEM

Příbalový leták STA-Liquid Fib

SHAH, Karishma a Panagiotis MAGHSOUDLOU. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine* [online]. 2016, 77(7), C98-C101 [cit. 2022-08-01]. ISSN 1750-8460. Dostupné z: doi:10.12968/hmed.2016.77.7.C98

Standardní operační postup technický (SOPT) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 010 Návod na obsluhu, kontrolu a údržbu analyzátoru STA-R Evolution, verze 03, 1.9.2017

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 004 Fibrinogen, verze č. 09, 1.9.2017

Standardní operační postup pro vyšetření (SOPV) laboratoře IV. interní hematologické kliniky FN Hradec Králové č. 004 Fibrinogen, verze č. 10, 17.6.2021

SURMA, Stanisław a Maciej BANACH. Fibrinogen and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases—Review of the Literature and Clinical Studies. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, 23(1) [cit. 2022-08-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23010193

TISCIA, Giovanni a Maurizio MARGAGLIONE. Human Fibrinogen: Molecular and Genetic Aspects of Congenital Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(6) [cit. 2022-08-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19061597

WEISEL, John W. Fibrinogen and Fibrin. In: *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* [online]. Elsevier, 2005, 2005, s. 247-299 [cit. 2022-08-01]. Advances in Protein Chemistry. ISBN 9780120342709. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-3233(05)70008-5

WEISEL, John W. a Rustem I. LITVINOV. Fibrin Formation, Structure and Properties. In: PARRY, David A.D. a John M. SQUIRE, ed. *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-01-19, s. 405-456 [cit. 2022-08-01]. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-3-319-49672-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-49674-0_13

15. PŘÍLOHY

Tabulka 8 Naměřené hodnoty koncentrace fibrinogenu u pacientů

Číslo vzorku	Koncentrace fibrinogenu v g/l (DG-FIB L Human)	Koncentrace fibrinogenu v g/l (STA-Liquid Fib)
1	6,16	7,89
2	5,81	7,52
3	0,70	0,75
4	0,90	0,93
5	1,27	1,21
6	1,17	1,05
7	1,25	1,06
8	1,06	1,03
9	0,99	0,96
10	1,01	1,08
11	1,13	1,01
12	0,66	0,60
13	1,29	1,15
14	0,94	1,05
15	1,42	1,24
16	1,50	1,51
17	1,06	1,03
18	1,48	1,62
19	1,37	1,20
20	1,35	1,21
21	1,09	1,01
22	1,17	1,25
23	1,44	1,32
24	1,68	1,71
25	0,95	0,91
26	1,71	1,70
27	1,35	1,19
28	1,18	1,24
29	1,03	0,88
30	1,33	1,16
31	1,79	1,60
32	1,42	1,31
33	1,45	1,50
34	0,59	0,72
35	1,48	1,30
36	2,49	2,25
37	3,06	2,93
38	2,94	2,88
39	3,38	3,21
40	2,17	2,08
41	3,72	4,09
42	3,03	2,90
43	2,70	2,39
44	3,06	3,35
45	2,35	2,03
46	2,55	2,70
47	3,68	4,18
48	4,61	4,74
49	3,11	3,16

50	3,62	3,93
51	5,46	6,00
52	3,77	4,01
53	4,40	4,37
54	3,50	4,05
55	3,19	3,35
56	2,70	2,53
57	3,12	2,95
58	3,22	3,21
59	3,50	3,35
60	6,39	7,10
61	3,30	3,35
62	2,75	2,88
63	5,00	4,86
64	4,76	5,05
65	6,39	7,52
66	4,69	4,74
67	5,00	6,19
68	3,83	3,81
69	6,13	7,88
70	5,00	5,12
71	4,10	4,37