

# Fibrinojen Tayin Yöntemlerinin Karşılaştırılması: Tarihsel Pencereden Bakış (Modifiye Stirlend, Clauss Kronometrik ve Sodyum Sülfite ile Fraksiyonizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması)

Comparison of Fibrinogen Determination Methods Looking from the Historical Window (Comparison of Modified Stirlend, Clauss Chronometric and Sodium Sulfite Fractionation Methods)

Pınar EKER 

## ÖZ

Günümüzde otoanalizörlerde kullanılan Clauss kronometrik yönteminin manuel versiyonu, daha eski bir metotla, Modifiye Stirlend yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Fibrinojenin sodyum sülfite ile presipitasyonu ve ardından fraksiyone edilen fibrinojenin Biüret yöntemi ile protein olarak ölçülmesi referans yöntem olarak kullanılmıştır. Çalışma aynı zamanda otoanalizörler ile rutin laboratuvar çalışmalarına dahil olan uzman ve öğrencilerin fibrinojen testlerinin tarihsel evrimi hakkında fikir oluşturmalarına yardımcı olacaktır.

Biüret yöntemine dayalı referans ve Modifiye Stirlend yöntemi karşılaştırıldığında, arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $t = -6,075$ ;  $p < 0,05$ ). Referans ve Clauss kronometrik yöntemi arasındaki fark istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ( $t = -1,833$ ;  $p = 0,076$ ). Modifiye Stirlend ve referans yöntemi arasındaki korelasyon yüksek düzeyde anlamlı ( $r = 0,898$ ;  $p < 0,001$ ); referans ve Clauss kronometrik yöntemi arasındaki korelasyon da yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur. ( $r = 0,845$ ;  $p < 0,001$ ). Her yöntemin deney içi tekrarlanabilirliği için ortalama varyasyonlar hesaplanmıştır. Bu değerler Biüret yöntemine dayalı referans, modifiye Stirlend ve Clauss kronometrik yöntemi için sırasıyla % 5,77; %6,78 ve %2,56'dır. Fibrinojen düzeylerinin ölçümünde manuel versiyonu kullanılmış olan Clauss kronometrik yöntemi, Modifiye Stirlend yöntemine oranla daha başarılı bulunmuştur. Manuel olarak uygulanan Clauss kronometrik yöntemi günümüzde otoanalizörlerde çalışılan bir metod şeklinde günlük biyokimya laboratuvar tıbbında yerini korumaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Fibrinojen, Yöntem Karşılaştırma, Klinik Kimya, Analiz

## ABSTRACT

The manual version of the Clauss chronometric method which is used in autoanalysers today, was compared with the Modified Stirlend method, which was older than Clauss chronometric method. Fractionation of fibrinogen which was precipitated with sodium sulfite followed determination as a protein by Biuret method was used as the reference method. The study will also help experts and students involved in routine laboratory work with autoanalysers to provide insight into the historical evolution of fibrinogen testing.

Significant difference was found between the reference method which was based on determination of fibrinogen by Biuret reagent and the Modified Stirlend method ( $t = -6,075$ ;  $p < 0,05$ ). The difference between the Reference and Clauss chronometric method was not statistically significant ( $t = -1,833$ ;  $p = 0,076$ ). The correlation between the modified Stirlend and the reference method is highly significant ( $r = 0,898$ ;  $p < 0,001$ ); Correlation between reference and Clauss chronometric method was also found highly significant. ( $r = 0,845$ ;  $p < 0,001$ ). Average variations were calculated for each method. These values are 5.77%, 6.78% and 2.56%, respectively, for reference, Modified Stirlend and Clauss chronometric method; The Clauss chronometric method, which was used in the manual version for measuring fibrinogen levels, was found to be more successful than the Modified Stirlend method. Clauss chronometric method, which was applied manually, still maintains its place in daily biochemistry laboratory medicine as in fully automated auto analyzers.

**Keywords:** Fibrinogen, Method Comparison, Clinical Chemistry, Analysis

## GİRİŞ

Çalışmada rutin laboratuvar fibrinojen tayininde uzun yıllar kullanılmış olan Modifiye Stirlend yöntemi (1) ile Clauss tarafından tanımlanmış olan hız ölçümüne dayalı kronometrik yöntemin (2) manuel versiyonu karşılaştırılmış ve referans yöntem olarak da fibrinojenin sodyum sülfite ile presipitasyonu ile fraksiyonizasyonu sonrası Biüret tekniği ile protein olarak ölçümüne dayalı yöntem kullanılmıştır (3). Günümüzde tıp teknolojisi hızla gelişmekte, tıbbi

Pınar EKER (✉)

*Istanbul İl Sağlık Müdürlüğü KHH Başkanlık-2 Merkezi Laboratuvarı-2  
Biyokimya ve Klinik  
e-mail: pinareker2@gmail.com*

Geliş Tarihi - Received: 21.12.2020

Kabul Tarihi - Accepted: 18.02.2021

laboratuvar teknikleri açısından ileri yöntemlerle çalışan teknik cihazlar her geçen gün laboratuvar pratiğimize dahil olmaktadır. Teknolojinin otomasyon yönünde hızlı gelişimi zaman kazanmak ve standardizasyon yönünden tıbbi laboratuvar uzmanına katkılarının çokça olmasının yanında, temel prensiplerin anlaşılması ve cihaz gelişim teknolojilerinin arka planda hangi yollardan geçerek günümüze ulaştığı bilgisinin uzmanlık eğitim sürecinde eksik kalmasına neden olmaktadır. Çalışmada manuel versiyonu kullanılmış olan Clauss tarafından tanımlanan yöntem günümüzde koagülasyon otoanalizörlerinde yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir (4, 5). Modifiye Stirlend yöntemi de kullanım kolaylığı ve ucuz olması gibi özellikleriyle uzun yıllar rutin biyokimya laboratuvarlarında kullanılmıştır (1). Çalışmanın temel amacı görece eski bir yöntem olan Modifiye Stirlend ve yaygın kullanımda olan Clauss metodunun referans yöntem kullanılarak performanslarının değerlendirilmesi şeklindedir. Aynı zamanda, alan profesyonelleri fibrinojen açısından ilerlenen bilimsel tarihsel yolculuk konusunda fikir geliştirebileceklerdir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada laboratuvarımıza başvuran fibrinojen testi istenmiş olan hastalar arasından rastgele, çalışma sonrası arta kalan toplam 34 plazma numunesinde üç farklı yöntemle fibrinojen tayini gerçekleştirildi. Hemolizli, lipemik ve bilirubinli örnekler çalışma dışı tutuldu. Her bir örnek eş zamanlı ve bekletilmeksizin her üç yöntemle; kronometrik fibrinojen tayin yöntemi (Clauss kronometrik), fibrinojenin ısı ile koagülasyonu esasına dayalı yöntem (Modifiye Stirlend) ve sodyum sülfid fraksiyonizasyonu kullanılarak fibrinojenin Biüret metodu ile ölçümü şeklinde çalışıldı. Örnekler alınırken antikoagülan olarak “Wintrob” karışımı (7) kullanıldı. Bu karışım, kuru çift okzalit karışımı olarak da adlandırılır. 1,2 g amonyum okzalit, 0,8 g potasyum okzalit ile 100 ml distile suda çözülür. Her ml kan için, 0,1 ml tüpe konur ve ince bir film tabakası şeklinde tüp duvarlarına dağılıncaya kadar döndürülür, ısı dekompozisyona neden olacağından, hava akımı karşısında kurutulur (8, 9). Hazırlanan tüplere 7ml kan için 0,7ml “Wintrob” karışımı ilave edildi ve yukarıdaki işlemler tekrarlandı. Kan ilavesinden sonra ince beyaz bir tabaka şeklinde kuruyan okzalit karışımının iyice karışmasını sağlamak amacıyla en az 10 kez yavaş bir şekilde tüpler alt üst edildi. Gerek solüsyonların hazırlanmasında, gerekse liyofilize reaktiflerin çözülmesi işlemlerinde distile su

kullanıldı. Deiyonize su koagülasyon testlerinde distile su kadar uygun değildir çünkü, deiyonize suyun içerdiği enzim ya da kontamine edici diğer maddeler bazı tekniklerde sorun yaratmıştır (10). Bu yüzden cam distile su koagülasyon testlerinde tercih edildi. Ayrıca testler sırasında, Boehringer-Mannheim 4010 fotometre, kronometre, su banyosu, çeşitli boylarda cam test tüpleri, reaktif çözmek için değişik hacimlerde balon jöjeler ve saklama amacıyla koyu renk cam şişeler, otomatik mikropipetler, cam pipetler ve santrifüj cihazı kullanılmıştır.

### Kronometrik Metot Prensibi

Dilüe edilmiş plazma, yoğun miktarda trombin ile karşılaştırılınca, pıhtılaşma zamanının logaritmik karşılığı, fibrinojen konsantrasyonunun logaritması ile lineer bir ilişki gösterir (2). Kronometrik fibrinojen kiti olarak “fibrinogène-kit” (bio Mérieux) kullanıldı. Test manuel metot kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için 37°C’de bir su banyosu, çeşitli kapasitelerde cam ve otomatik pipetler, bir kronometre kullanıldı. Kalibrasyon için referans plazma olarak “Caliplasma” (citratè) (bio Mérieux) kullanıldı.

### Test Prosedürü

100 NIH U/ml trombin içeren R<sub>1</sub> şişesi, 3ml distile su ile sulandırıldı. 20-25°C’de 8 saat, 2-8°C’de 48 saat ve –20°C’de 1 ay dayanıklı olan bu reaktif, her defasında 1 şişe bitecek şekilde saklanmadan kullanıldı. Testten önce reaktif 20-25°C sıcaklığa getirildi, ancak inkübe edilmedi. Plazma örnekleri test sırasında pH 7.35 şeklinde Veronal tampon içeren R<sub>2</sub> reaktif ile 1/10 dilüe edildi. 0,2ml dilüe plazma 37°C’de 2dk. inkübe edildi ve inkübe edilmemiş reaktif 1 ilave edilerek (0,2ml) kronometre çalıştırıldı. Siyah bir zemin önünde (duvarları şeffaf su banyosunun arka yüzü siyah bir kağıt ile kaplandı) pıhtılaşma anı tespit edildi. Ucu çengel şeklinde bir tel ile oluşan fibrinin ardışık hareketlerle yakalanması ve ilk takılma anında kronometrenin de durdurulması ile saptandı. Her test çift kez çalışıldı. Kontrol olarak “Coag Control-N” (Diagnostica Stago) kullanıldı.

### Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için fibrinojen kiti içinde bulunan R<sub>2</sub> (diluent) kullanılarak (veronal tampon) fibrinojen içeriği 2,5gr/l olan “Caliplasma”dan dilüsyonlar hazırlandı. Her dilüsyon için test prosedürü çift uygulandı. Sonuçlar her iki eksenini de logaritmik grafik kağıdı

üzerinde işaretlendi. Elde edilen noktalardan geçen grafik, testler sırasında bulunan saniye değerlerine karşılık gelen fibrinojen miktarının saptanmasında kullanıldı. Bulunan saniye değerine karşılık gelen nokta (k faktörü) grafik yardımıyla bulundu ve şu formülde yerine kondu: %mg. Fibrinojen = k. dilüsyon sayısı

Örneğin; dilüsyon 1/10 olduğunda: %mg. Fibrinojen = k.10 olarak hesaplandı. Daha net ve doğru dönüşümler yapabilmek için yukarıdaki dilüsyonlara karşılık gelen saniye değerlerinin ortalamaları ve % mg fibrinojen değerlerini kullanarak regresyon analizi yapıp, regresyon eşitliği elde edildi. Bu eşitlik kullanılarak yöntemlerde elde edilen değerlerden “k” faktörü hesaplandı. Daha sonra k dilüsyon sayısı formülünden %mg fibrinojen değerlerine ulaşıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Clauss Kronometrik yöntemi için kalibrasyon dilüsyon değerleri ve karşılık gelen saniye cinsinden ölçüm değerleri ve kalibrasyon için regresyon denklemi

Dilüsyonlar	1/5	1/10	1/15	1/20
Plazma (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
Reaktif 2 (ml)	0.4	0.9	1.4	1.9
Fibrinojen düzeyi (mg/dl)	50	25	16.7	12.5
Saniye değerleri	5.25	11.18	16.05	21.47
K. faktörü	50	25	16.7	12.5
Regresyon eşitliği:	$y = -27.29 \ln(x) + 93.694$ $R^2 = 0.9786$			

### Fibrinojenin Isı ile Koagülasyonu Esasına Dayalı Yöntem (Modifiye Striland)

Nötral solüsyonlarda fibrinojenin koagülasyon sıcaklığı olan 55°C’de ısıtılması ile oluşan turbiditenin, fibrinojenin konsantrasyonu ile doğru orantılı olması ve bu bulanıklığın 24 saate kadar dayanıklı olması prensibine dayalıdır (1). Test prosedürü uyarınca Wintrob karışımı kullanılarak elde edilen plazma kullanıldı. Sitratl plazma bu yöntem için uygun değildir (1). İki deney tüpü test ve kör olarak işaretlendi. Bunların her birine 0,3 ml plazma ve 3 ml % 0,85’lik sodyum klorür solüsyonu konularak, karıştırıldı (alt üst edilerek) ve test tüpü 56°C’de su banyosunda 15 dakika bekletildi. Test tüpü su banyosundan çıkarılarak oda ısısına kadar soğutuldu. Spektrofotometre kör deneyi ile sıfıra ayarlandı ve 620 nm’de testin bulanıklığı okundu. Elde edilen optik dansite hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisinde okundu ve % mg fibrinojen bulundu (1, 11). Çalışmada her test çift olarak çalışıldı.

### Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

20 timol bulanıklık ünitesi (kunkel gama globülin ünitesi) testte %590 mg fibrinojen içeren bir plazmada oluşan bulanıklığa eş değer bulanıklık verir. Bu ilişki %600 mg fibrinojen düzeylerine kadar lineerdir (11). 20 timol bulanıklık ünitesine karşılık gelen solüsyon şu şekilde hazırlandı (12); 1.173 g saf baryum klorür ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) 100 ml’lik bir balonjojeye konularak, bir miktar distile su ile eritildi ve 100 ml’ye tamamlandı. Bu solüsyondan 3ml alınarak bir balona konularak ve 0.2 N- $H_2SO_4$  ile 100ml’ye tamamlanarak, karıştırıldı. Bu standart solüsyon 20 timol bulanıklık ünitesine eşittir. Daha sonra 5 tüp alındı, bunlara 20 ünitelik standart solüsyondan sırası ile 0, 2.5, 5, 7.5 ve 10ml kondu. Distile su ile 10 ml’ye tamamlandı, karıştırıldı. Bu standartlar 0, 5, 10, 15, ve 20 üniteye eşit olarak belirlendi. Kör ile (distile su) fotometrede okundu ve normal grafik kağıdında x eksenine optik dansiteler, y eksenine de bulanıklık üniteleri işaretlendi. Doğru çizildi. Testlerin sonuçlandırılmasında bu grafik üzerinde her optik dansiteye karşılık gelen %mg. fibrinojen değeri bulundu. Clauss Kronometrik yönteminde olduğu gibi, kalibrasyon için çalışılan absorpsans ve %mg. fibrinojen değerleri kullanılarak regresyon eşitliği Modifiye Striland yöntemi için oluşturuldu. Bu eşitlikten yararlanılarak absorpsans test değerleri %mg fibrinojen değerlerine dönüştürüldü (Tablo 2).

**Tablo 2.** Modifiye Striland yöntemi kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasına temel teşkil eden değerler.

Absorbans (x)	%mg Fibrinojen (Y)	Bulanıklık ünitesi
0,156	147.5	5
0,304	295	10
0,439	442.5	15
0,551	590	20
Regresyon eşitliği:	$y = 1.1132x - 34.792$ $R^2 = 0.9962$	

### Sodyum Sülfid Fraksiyonizasyonu Kullanılarak Fibrinojen Ölçümü

Fibrinojenin tuz karışımlarındaki düşük çözünürlük karakteristiğine dayalı bir testtir (3). %13’lük sodyum sülfid solüsyonu seçici olarak fibrinojen presipitasyonuna neden olur. Diğer serum proteinleri presipite olmaz. %13’lük sodyum sülfid ( $Na_2SO_3$ ) ile presipite ettirilen fibrinojenin, Biüret reaksiyonu kullanılarak, protein olarak ölçülmesi esasına dayalı bu test, çalışmada referans yöntem olarak kullanılmıştır (13,14).

## Reaktifler

%13'lük  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  Solüsyonu, %5'lik Trisodyum Fosfat Solüsyonu ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), %4'lük Bakır Sülfat Solüsyonu ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Stok Standart Protein Solüsyonu (%5'lik albümin standardının dilüsyonu yoluyla )1 g/100 ml olacak şekilde hazırlanır. Dilüe standart protein solüsyonları stok standart protein solüsyonundan 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 ml test tüplerine pipetlenerek ve her biri % 0,85'lik sodyum klorür solüsyonu ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. 0,7 ml Wintrob reaktifi üzerine alınan 7 ml kanın iyice karışması sağlanarak tüpler bekletilmeden santrifüj edildi. Plazma hemen ayrılarak kullanıldı.

## Test Yöntemi

10 ml su ile işaretlenmiş test tüpleri kullanıldı. Kuru test tüplerine 1ml plazma konuldu, 9.0 ml sodyum sülfat solüsyonu eklendi ve karıştırıldı.  $37^\circ\text{C}$ 'de 10 dk. süreyle inkübe edildi. Bol miktarda beyaz bulutlanma şeklinde presipitat kolayca gözlemlendi. Tüpler 1500 g devirde 5-10 dk süreyle santrifüj edildi. Presipitat tüpün dibinde sert bir kitle olarak toplandı ve üstte berrak süpernatant izlendi. Bu kısım dökülerek tüplerin 1dk. boyunca süzülmesi sağlandı. Emici bir kağıtla tüpün ağzında biriken son damlalar kurulandı. 5 ml sodyum sülfat solüsyonu fişkırtır şekilde püskürtülerek (enjektörden yararlanıldı) presipitatın dağılması sağlandı. Tüpler lastik kapaklarla kapatıldı ve presipitat süspansiyon haline gelinceye kadar kuvvetli şekilde çalkalandı. Kapaklar açılarak tüpün duvarlarını yıkayacak şekilde 3 ml sodyum sülfat solüsyonu ilave edildi. Tekrar santrifüj edildi, üstte kalan kısım döküldü ve tüpler süzüldü. İşlem sırasında sıvı yüzeyinde ince bir film tabakası oluştuğu ve bu tabakanın tüp duvarına tutunarak kaldığı gözlemlendi. 10 ml %5'lik trisodyum fosfat solüsyonu her bir tüpe ilave edildi. Tüpler kaynamakta olan su banyosuna yerleştirildi ve protein presipitat çözülünceye kadar kaynatıldı. Bu işlem 15-20 dk içinde gerçekleşti. Tüpler soğuk su banyosunda soğutuldu. Bu sırada buharlaşan sıvı kısım, işaretli yere kadar trisodyum fosfat solüsyonu ile tamamlandı. 0.2ml de %4'lük bakır sülfat solüsyonu ilave edilerek ağızları kapatıldı, kuvvetli bir şekilde 2-3 dk. çalkalanarak, kapaklar açıldı ve 1500 g de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant 546 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Bir kör deney de örnek yerine su kullanılarak test boyunca çalışıldı ve sıfırlama bu köre karşı yapıldı. Her test çift olmak üzere yukarıdaki prosedüre göre çalışıldı.

## Standart Protein Solüsyonlarının Çalışılma Prosedürü

Dilüe protein solüsyonlarından 1'er ml 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 g/dl konsantrasyonlarında olacak şekilde tüplere pipetlendi. Bu tüplere 9ml %5'lik fosfat solüsyonundan ilave edildi ve fibrinojen ölçümündeki sonraki basamaklar izlendi. Normal grafik kağıdına %mg protein değerleri y eksenine, absorban değerleri de x eksenine gelecek şekilde işaretlendi ve doğru çizildi. Diğer iki yöntemde de olduğu gibi bu yöntem için de regresyon analizinden yararlanılarak standart protein solüsyon değerleri için bir regresyon eşitliği elde edildi. %mg fibrinojen dönüşümleri bu eşitlikten yararlanılarak yapıldı (Tablo 3).

**Tablo 3.** Referans metod kalibrasyon eğrisine temel teşkil eden değerler

Absorbans (x)	%mg. Fibrinojen (y)
0,087	100
0,117	200
0,138	300
0,165	400
0,188	500
0,206	600
0,227	700
0,244	800
0,285	900
Regresyon eşitliği:	$y = 4.5485x - 327.32$ $R^2 = 0.9946$

## BULGULAR

Her üç yöntemde kalibrasyon için çalışılan absorban, saniye ve %mg fibrinojen değerleri kullanılarak regresyon analizi yapılarak regresyon eşitlikleri elde edildi. Bu eşitlikler kullanılarak yöntemlerde elde edilen test sonuçları %mg fibrinojen değerlerine dönüştürüldü (Tablo 4).

**Tablo 4.** %mg fibrinojen değerleri

No	MODİFİYE STİRLAND YÖNTEMİ		CLAUSS KRONOMETRİK YÖNTEMİ		REFERANS YÖNTEMİ	
	1. Sonuç	2. Sonuç	1. Sonuç	2. Sonuç	1. Sonuç	2. Sonuç
1	394.9	380.4	334.3	351.3	380.9	385.5
2	221.2	230.2	337.3	321.1	285.6	276.5
3	315.9	329.2	360.7	369.4	285.6	303.7
4	432.8	510.7	442.1	440.7	535.3	539.8
5	441.7	490.6	410.2	405.9	485.3	489.9
6	546.3	528.5	426.1	405.9	467.2	491.4
7	321.4	325.9	351.3	354.5	331.0	355.0
8	333.7	336.0	346.5	345.9	485.3	500.5



9	348.2	289.1	341.9	337.3	376.4	385.5
10	151.1	194.5	318.0	337.3	449.0	444.5
11	229.0	221.2	329.0	333.1	194.8	218.5
12	221.2	239.0	320.0	325.7	326.4	355.0
13	490.6	525.1	407.0	420.7	626.0	603.4
14	313.6	272.5	316.0	320.2	299.2	318.6
15	395.0	391.6	432.0	448.0	503.5	521.7
16	372.6	390.5	417.8	429.9	562.5	580.7
17	389.3	420.5	403.5	426.1	535.3	582.4
18	599.8	604.2	492.8	492.3	598.8	603.4
19	256.9	231.2	344.7	328.3	376.4	400.4
20	236.8	241.3	297.6	295.5	303.7	323.1
21	245.7	226.8	376.7	359.4	344.6	367.3
22	270.2	229.0	352.9	351.0	376.4	394.5
23	98.8	110.0	198.2	197.5	122.1	150.3
24	115.5	138.9	258.8	243.3	153.9	172.0
25	234.6	224.6	295.2	289.6	262.9	299.2
26	141.1	150.0	300.5	295.2	217.5	244.7
27	177.8	172.3	305.8	290.1	176.6	204.9
28	322.5	312.5	362.7	369.4	467.2	485.3
29	207.9	193.4	304.5	303.7	217.5	245.8
30	232.4	254.6	308.5	305.8	353.7	390.0
31	254.6	275.8	305.8	303.1	376.4	400.4
32	203.4	205.7	259.9	281.3	235.6	262.9
33	171.2	180.1	280.0	275.2	190.2	208.4
34	315.9	322.5	352.9	349.7	367.3	391.3

Veriler Excel ortamından “IBM SPSS Statistics 22” programına aktarılarak analizler tamamlandı. Değerlerin normalliği “Kolmogorov Smirnov” normallik testi ile kontrol edildi ve normallik sağlandığı görüldüğü için, yöntemler arasındaki karşılaştırmalarda parametrik test olan bağımlı örneklem T testi kullanıldı. Yöntemler arasında nedensel olmayan ilişki derecesinin belirlenmesi için “Pearson” korelasyon katsayısı kullanılmıştır. Her bir yöntemin 1. ve 2. sonuçları arasındaki uyum düzeyleri sınıf içi korelasyon katsayısı (ICC) ile değerlendirildi (Tablo 5).

**Tablo 5.** Yöntemlere ait tanımlayıcı istatistikler ve tekrarlar arası uyum değerleri

Yöntemlere Ait Tanımlayıcı İstatistikler			
Ortalama %mg Fibrinojen Değerleri	Yöntem		
	Modifiye Stirlend	Kronometrik	Referans
n (Olgu Sayısı)	34	34	34
Ortalama	296,35	344,04	370,1
Medyan	257,4	338,05	375,58
Standart Sapma	120,836	61,14	130,973
Varyans	14601,43	3738,06	17154,01
Range	497,6	294,7	478,5

Minimum	104,4	197,85	136,2
Maksimum	602	492,55	614,7
%95 Güven Aralığı (GA)	254,19 – 338,51	322,71 – 365,37	324,40 – 415,79
Yöntemlere ait 1. ve 2. Sonuçların Arasındaki Uyum			
	Modifiye Stirlend	Kronometrik	Referans
Uyum Katsayısı; ICC*	0,976	0,983	0,995
Anlamlılık; p	<b>0,000**</b>	<b>0,000**</b>	<b>0,000**</b>
Uyum Düzeyi	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi
Ortalama değişim değeri (Averaj Varyasyon)	% 6.78	% 2.56	% 5.77
*ICC: Intraclass Correlation Coefficient (Sınıfçı Korelasyon Katsayısı) ; ** : p<0,001			

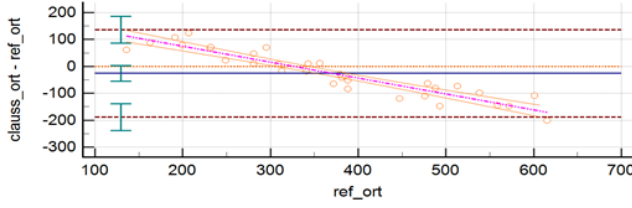
Tekrarlanabilirlik açısından her bir yöntemdeki 1. ve 2. sonuçlar arasındaki uyum çok iyi olarak bulundu ( $p<0,05$ ). Modifiye Stirlend ve Clauss kronometrik yöntemi ile referans yöntem arasındaki ilişkiyi belirlemek için korelasyon analizi uygulandı (Tablo 6). Korelasyon analizi sonucunda modifiye Stirlend yöntem değerleri ile referans yöntem değerleri arasında yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı doğrusal bir ilişki olduğu ( $r=0,898$ ;  $p<0,001$ ), kronometrik yöntem değerleri ile referans yöntem değerleri arasında da yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı doğrusal bir ilişki olduğu ( $r=0,845$ ;  $p<0,001$ ) tespit edildi. Yöntemler arasında farklılık olup olmadığı ise bağımlı örneklem t testi ile incelendi. Uygulanan bağımlı örneklem t testi sonucunda Clauss kronometrik yöntem ile referans yöntem değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemişken ( $p>0,05$ ) modifiye Stirlend yöntemi ile referans yöntem değerlerinin ortalamaları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ( $p<0,05$ ).

**Tablo 6.** Modifiye Stirlend ve Clauss kronometrik yöntem değerleri ile referans yöntem değerleri arasındaki farklılık analiz sonuçları

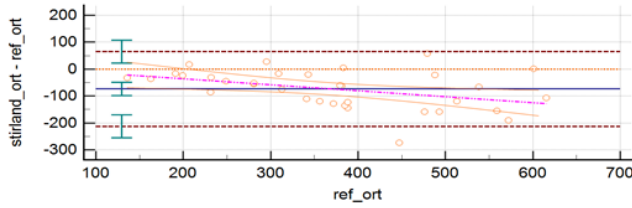
Yöntem	Test Sayısı	Referans Yöntemi ile Korelasyon		Referans Yöntemi ile Karşılaştırma	
		r	p	t	p
Modifiye Stirlend	34	0,898	0,000***	-6,075	0,000***
Clauss Kronometrik	34	0,845	0,000***	-1,833	0,076

\*\*\*:  $p<0,001$ ,  $r$ =Pearson Korelasyon Katsayısı,  $t$ =Bağımlı Örneklem T Testi  $p$ =Anlamlılık Düzeyi

Grafik 1-A



Grafik 1-B



**Grafik 1-A / 1-B** Sodyum sülfid ile fraksiyonizasyonu takiben fibrinojenin Biüret metodu ile ölçüldüğü referans metod ile karşılaştırılma için Bland Altman uygulamasına göre Clauss (1-A) ve Modifiye Stirland yöntemlerinin (1-B) grafiksel değerlendirilmesi (15,16).

Çalışmada deney içi tekrarlanabilirlik araştırması açısından, duplike çalışmalardan hesaplanması mümkün olan bir tekrarlanabilirlik parametresi olarak ortalama değişim (averaj varyasyon) ölçütü kullanıldı. Ortalama değişim değerleri referans yönteminde %5.77, Modifiye Stirland yönteminde %6.78 ve Clauss kronometrik yönteminde de %2.56 olarak hesaplandı (Tablo 5).

Çalışmamızda özellikle referans metod için çok fazla miktarda plazma kullanılması gerektiğinden plazma havuzu hazırlanarak günler arası presizyon değerlendirmesi mümkün olamamıştır. Ticari olarak hazırlanmış fibrinojen kontrol materyallerinin var olmasına karşın, eldeleri için antikoagülan olarak sitrat kullanılmış olması modifiye Stirland yöntemi için engelleyici olmuştur. Ortalama değişim parametresini kullanmanın bir avantajı da bizzat korelasyon analizine temel teşkil eden değerlerin tekrarlanabilirliğini ölçmesi olarak değerlendirilebilir (17).

## TARTIŞMA

Fibrinojen ölçümü için bugüne değin çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Trombin ile pıhtılaşabilen proteinin kimyasal olarak ölçülmesi, tuz ve ısı presipitasyon teknikleri, turbidimetrik yöntemler, elektroforez ve immunokimyasal yöntemler olarak kabaca özetlenebilir. Yöntemlerin çeşitli çalışmalarda farklı yönleriyle (doğruluk, basitlik, güvenilirlik ve maliyet gibi) birbirleriyle gösterdikleri uyum incelenmiştir (13, 14, 17-20). Çalışmalarda referans yöntem olarak da çok sayıda yöntem kullanılmıştır. Kan kimya analiz kitlerinin standardizasyonu konusunda karşılaşılan zorluklar, fibrinojen tayin yöntemi örneğinde bir arada toplanmış gibidir; nedeni basit, hızlı bir referans metodun eksikliğidir. Genel olarak pıhtılaşabilen proteinin ölçüldüğü yöntemlerin en doğru ve tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar verdiği konusunda fikir birliği söz konusudur (21, 22). Buna karşın bu tekniklerin klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanımını engelleyen çeşitli problemleri söz konusudur. Bunlar kompleks, çok basamaklı ve dolayısıyla büyük hata potansiyelinde olan prosedürlerdir (20, 3). Ayrıca bu yöntemler uygulama konusunda deneyim ve çok büyük titizlik gerektirmektedir. Modifiye Stirland yöntemi uzun yıllar laboratuvarımızda rutinde kullanılan bir yöntem olmuştur. Çalışmamıza dahil olmasındaki amaç, kolay uygulanabilen ve maliyeti çok düşük olan bu testin referans yöntemle nasıl bir uyum gösterdiğinin araştırılmasıdır. Karşılaştırma konusu olan diğer metod ise günümüzde yaygın biçimde kullanılan, rölatif olarak maliyeti yüksek bir yöntemdir.

Bu çalışmada, yıllarca kullanılan ve maliyeti çok düşük olan Modifiye Stirland yöntemi ile günümüzde yaygın kullanımda olan Clauss tarafından ortaya atılan metodu esas alan bir ticari kitin hastanemiz laboratuvar koşullarında doğruluk ve sadece çalışma içi tekrarlanabilirliği araştırıldı. Referans yöntem olarak sodyum sülfid ile fraksiyonizasyonu takiben, Biüret ile protein ölçümü esasına dayalı tekniği kullanıldı. %13'lük sodyum sülfid solüsyonu seçici olarak fibrinojen presipitasyonuna neden olmaktadır (3). Aynı prosedür çeşitli çalışmalarda referans yöntem olarak kullanılmıştır (13,14). Trombin zamanı esasına dayalı test, ilk kez Clauss tarafından kullanılmıştır (2). Pıhtı formasyon hızına dayalı bir testtir. Rutinde kullanılmak üzere College of American Pathologists (CAP) programı tarafından bu yöntem tüm diğer yöntemlere tercih edilebilir olarak değerlendirilmiştir (22). Günümüzde rutinde Clauss tarafından tanımlanan orijinal yöntem temel alınarak hazırlanmış ve kullanıma sunulmuş "kit" formları yaygın

olarak kullanılmaktadır (18). Stirlend tarafından önerilen yöntem bu üç metot içinde en eskisidir. Plazmanın salin solüsyonlarının 56 °C derecede ısıtılması ile oluşan turbiditenin fibrinojen konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu esasına dayanır (1).

Clauss kronometrik yöntem ile referans yöntem değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiş ( $p>0,05$ ) iken modifiye Stirlend yöntemi ile referans yöntem değerlerinin ortalamaları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

Aynı sonucun tekrarlarında elde edilebilme yeteneği açısından kronometrik testin (Ortalama değişim: %2,56) modifiye Stirlend yöntemine (Ortalama değişim: %6,78) üstün olduğu bulunmuştur. Değerlendirmeler göz önüne alındığında sadece referans olarak alınan yöntemle ilişkisi ve test içi tekrarlanabilirlik ölçütleri açısından Clauss kronometrik yöntemi fibrinojen düzey ölçümlerinde daha başarılıdır. İstatistiki başarının dışında, kronometrik yöntemin modifiye Stirlend yöntemine oranla birkaç konuda daha üstünlüğü söz konusudur. Clauss'a ait kronometrik yöntemin yaygınlaşması, beraberinde materyal çeşitliliğini getirmiştir. Kit, kalibratör, kontrol örnekleri ve otomasyonda kullanılacak cihazların varlığı, kalite kontrol yöntemlerinin bu yöntemle uyulanabilirliğini sağlamaktadır. Otomasyonla kolayca uygulanabilirliği, manuel aşamaların ekarte edilebilmesini sağlayarak, çabuk, doğru, tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesine imkan vermektedir. Her iki yöntem için alınacak numune özellikleri açısından değerlendirme yapıldığında; Kronometrik yöntem için sitrat ile alınacak düşük miktardaki (2ml) kan hacminden elde edilecek plazma ile hemostaz testlerinde birlikte istenme olasılığı yüksek olan aPTT ve PT gibi testler de çalışılabilecektir. Oysa modifiye Stirlend yönteminde sitratlı plazma kullanılamıyor olması aynı durum açısından imkansızdır. Ayrıca modifiye Stirlend yöntemi için gerekli olan plazma hacminin sadece 1/6'sı Clauss kronometrik yöntemi için yeterli olabilmektedir.

## SONUÇ

Çalışmada biyokimyasal bir tarihsel süreç içerisinde fibrinojen ölçümünün evrimsel gelişimine de örnek teşkil eden farklı yöntemler karşılaştırılmıştır. Bu yöntemlerden manuel versiyonu detaylı olarak anlatılmış olan Clauss kronometrik fibrinojen tayin yöntemi otoanalizör sistemlerinde günümüz teknolojisinde halen yaygın

olarak kullanılmaktadır. Mali yönden modifiye Stirlend yönteminin üstünlüğü tartışılmaz olmasına karşın, Clauss kronometrik yönteminin doğruluk, test içi tekrarlanabilirlik, basitlik, rutine uygun oluş ve kalite kontrol açısından uygun materyal sağlanabilirliği gibi üstün özellikleri, rölatif olarak pahalı olmasının önemsenmemesine de geçecek niteliktedir.

## KAYNAKLAR

1. Stirlend RM. A rapid method of estimating fibrinogen. *Lancet*. 1956; May 12;270(6924):672.
2. Clauss A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematologica*. 1957;17: 237-246.
3. Goodwin JF. Estimation of Plasma Fibrinogen, Using Sodium Sulfite Fractionation. *Am. J. Clin. Pathol.* 1961;35(3):227-232.
4. Zacharski LR, R. Rosenstein R. Comparison of the reaction – rate and clot density methods for determination of plasma Fibrinogen. *Am. J. Clin. Pathol.* 1977;68(1):45-52.
5. Cunningham MT, Olson JD, Chandler WL, Van Cott EM, Eby CS, Teruya J, Hollensead SC, Adcock DM, Allison PM, Kottke-Marchant KK, Smith MD. External quality assurance of fibrinogen assays using normal plasma: results of the 2008 College of American Pathologists proficiency testing program in coagulation. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Jul;136(7):789-95.
6. Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thromb Res*. 2010;126(6):e428–e433.
7. Ratnoff OD, Menzie C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J. Lab Clin Med*.1951;37(2):316-20.
8. Reiner M, Cheung HL. A practical method for the determination of fibrinogen. *Clinical Chemistry*. 1959;5(5):414–420.
9. Aras K, Ersen G, Klinik Biyokimya. Syf: 125, 1977.
10. Giddins JC. Blood Coagulation and Haemostasis: Hereditary coagulation disorders: laboratory techniques., Editör: Jean M. Thompson, Second Edition. 1980: 117.
11. Aras K, Ersen G, Klinik Biyokimya. Syf: 454, 1977.
12. Aras K, Ersen G, Klinik Biyokimya. Syf: 175, 1977.
13. Jesse F. Goodwin. An Evaluation of Tecnic for the separation and Estimation of Plasma Fibrinogen. *Clin-Chem*, 1965;Jan 11, pages:63-73.
14. Goodwin JF. An Evaluation of Turbidimetric Tecnic for Estimation of Plasma Fibrinogen. *Clinical Chemistry* 1967;13(12):1057-1064.
15. Bland JM, Altman DG. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. 1986;i:307-310.
16. Bland JM, Altman DG .Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*. 1999;8:135-160.

17. Exner T, Burrige J, Power P, Rickard KA. An evaluation of currently available methods for plasma fibrinogen. *Am J Clin Pathol.* 1979 May;71(5):521-527.
18. Zacharski LR, Rosenstein R. Comparison of the reaction rate and clot density methods for determination of plasma fibrinogen. *Am. J. Clin. Pathol.* 1977;68(1):45-52.
19. Stevens DJ, Sanfelippo MJ. Evaluation of three methods for plasma fibrinogen determination. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973;60(2):182-187.
20. Filip DJ, Eckstein JD, Sibley CA. Observations on diagnostic kits for the determination of plasma fibrinogen. *Am J Clin Pathol.* 1974 Jul;62(1):32-9.
21. Blood Coagulation and Haemostasis: The Laboratory investigation of Fibrinolysis. Edited by Jean M. Thomson. Second Edition, page: 232 1980.
22. Koepke JA, Gilmer PR Jr, Filip DJ, Eckstein JD, Sibley CA. Studies of fibrinogen measurement in the CAP survey program. *Am J Clin Pathol.* 1975 Jun;63(6 SUPPL):984-989.