

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения растворимых фибрин-мономерных комплексов в плазме крови

РФМК-тест

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор РФМК-тест предназначен для качественного определения в плазме крови растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), являющихся маркерами внутрисосудистого свертывания крови при тромбозах, тромбоемболиях, ДВС-синдромах различного генеза.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Принцип метода определения РФМК в плазме крови заключается в появлении в плазме, содержащей РФМК, зёрен (паракоагулята) фибрина после добавления к ней раствора фенантролина.

Состав набора. 1. Орто-фенантролина гидрохлорид, 70 мг - 2 фл. (в планшетном варианте набора реактив расфасован в 96 лунках планшета).

2. Контроль-минус (лиофилизированная плазма человека, не содержащая РФМК) - 1 фл.

3. Контроль-плюс (лиофилизированная плазма человека, содержащая РФМК) - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Получаемые при применении набора РФМК-тест результаты являются качественными, т.е. расцениваются как положительные или отрицательные.

При исследовании контрольной плазмы (Контроль-минус), входящей в состав набора РФМК-тест, отмечается отсутствие паракоагуляции в течение 60 с.

При исследовании контрольной плазмы (Контроль-плюс), также входящей в состав набора, отмечается наличие паракоагуляции в пределах от 5 до 40 с.

Тест не чувствителен к присутствию в крови антикоагулянтов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- осветитель для микроскопа;
- скарификатор-копё (для планшетного варианта набора);
- пипетки вместимостью 0,1 мл; 1,0 мл; 10,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% раствор натрия лимоннокислого 3-х замещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Внимание! Тест особо чувствителен к погрешностям при получении крови. Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз, избыток цитрата натрия и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови. Указанные погрешности приводят к "внутрипробирочному" образованию РФМК и завышению результатов определений.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

А. Разведение о-фенантролина гидрохлорида.

В один из двух флаконов с орто-фенантролина гидрохлоридом (далее по тексту - фенантролином) внести 10,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°C) и легком покачивании в течение 2 мин. В результате получают раствор фенантролина. Аналогично, по мере необходимости, развести содержимое второго флакона с фенантролином.

В планшетном варианте набора после надреза и удаления с помощью скарификатора участка пленки над одной из лунок планшета, в лунку при комнатной температуре внести 0,25 мл дистиллированной воды. После пипетирования в течение 10-15 с получают раствор фенантролина.

Б. Разведение контрольной плазмы (Контроль-плюс и Контроль-минус).

Во флакон с плазмой, содержащей РФМК (Контроль-плюс), внести 0,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 3 мин. Аналогично развести содержимое флакона с плазмой, не содержащей РФМК (Контроль-минус). Допускается наличие незначительного сгустка фибрина в Контроле-плюс.

Контрольная плазма разводится в день начала использования реагентов набора РФМК-тест и служит для проверки правильности выполнения анализа. Используется в течение 1 ч после разведения в условиях хранения при комнатной температуре.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Определения проводят при комнатной температуре (+18...+25°C) смешиваемых реагентов.

К 0,1 мл исследуемой плазмы крови, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл раствора фенантролина. Включить секундомер и при периодическом покачивании пробирки в проходящем свете от осветителя в течение 60 с отметить появление зёрен паракоагулята (в случае положительного результата) или их отсутствие (отрицательный результат).

В нормальной плазме крови результат отрицательный.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ВАРИАНТ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РФМК В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Принцип метода. Тот же, но с оценкой времени появления в исследуемой плазме зерен (паракоагулята) фибрина после добавления к ней фенантролина. Это время тем короче, чем выше концентрация РФМК в плазме.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

К 0,1 мл исследуемой плазмы крови, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл раствора фенантролина. Немедленно включить секундомер. При непрерывном покачивании пробирки в проходящем свете (желательно использовать осветитель для микроскопа типа ОИ-19 и черный фон) регистрируют время от момента добавления реагента до начала появления первых зерен фибрина. Учет провести на протяжении 150 с.

Оценка результатов. Тест считается положительным, если в плазме в первые 150 с регистрируются хорошо видимые в проходящем свете зерна (паракоагулят) фибрина. Отметить время их появления в секундах и по таблице определить количество РФМК в исследуемой плазме.

Перевод результатов (сек) в количественное содержание РФМК в плазме

Время, сек	Концентрация РФМК, мг/100 мл	Время, сек	Концентрация РФМК, мг/100 мл
5-6	28,0	21-23	10,0
7	26,0	24-25	9,0
8	24,0	26	8,5
9	22,0	27-28	8,0
10	21,0	29-31	7,5
11	19,0	32-33	7,0
12	17,0	34-36	6,5
13	16,0	37-40	6,0
14	15,0	41-45	5,5
15	14,0	46-54	5,0
16	13,0	55-69	4,5
17-18	12,0	70-87	4,0
19-20	11,0	88-120	3,5
		свыше 120	3,0

В норме содержание РФМК в плазме по количественному варианту методики составляет в среднем $3,38 \pm 0,02$ мг/100 мл (или 3,38 мг%), с верхним пределом нормы 4,0 мг/100 мл.

Повышение уровня РФМК характерно для активации свертывания крови, причем, чем больше их концентрация, тем выше риск внутрисосудистого тромбообразования. Эффект от гепаринотерапии проявляется снижением ранее повышенного показателя.

Ложное завышение результатов теста наблюдается при:

- дефектах в заборе крови, приводящих к активации свертывания *in vitro* (чаще всего - при недостаточном перемешивании крови и цитрата натрия);
- хранении плазмы до анализа более 1 ч.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на проведение 200 анализов при расходе растворов реагентов по 0,1 мл на 1 анализ.

Хранение набора должно проводиться при температуре $+2...+8$ °С в течение всего срока годности набора (24 мес). Допускается хранение при температуре до $+25$ °С в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Раствор фенантролина можно хранить при комнатной температуре ($+18...+25$ °С) не более 3 недель, не замораживать.

Разведенную контрольную плазму можно хранить при комнатной температуре не более 1 часа, не замораживать.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Новые методы лабораторной диагностики диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома)/ Баркаган З.С. и др.// Методические рекомендации МЗ СССР. - М., 1989. - 26 с.
2. Момот А.П., Елыкомов В.А., Баркаган З.С. Методика и клиническое значение паракоагуляционного фенантролинового теста. //Клинич. лабораторная диагностика. - 1996. - N 4. - С. 17-20.