

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения концентрации фибриногена

Фибриноген-тест

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для быстрого количественного определения содержания фибриногена в плазме крови (хронометрический метод по Clauss) на коагулометре.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Заключается в определении времени свертывания разбавленной цитратной плазмы избытком тромбина. Время свертывания при этом пропорционально концентрации фибриногена, которую определяют по калибровочному графику.

Состав набора.

1. Тромбин (лиофильно высушенный реагент, 500 ед НИН) - 2 фл.
2. Растворитель для тромбина, 10,5 мл - 1 фл.
3. Стандарт-плазма с известным содержанием фибриногена (лиофильно высушенная) - 1 фл.
4. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения - в диапазоне от 1,0 до 6,0 г/л (без дополнительных разведений плазмы).

Коэффициент вариации результатов определения концентрации фибриногена не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения концентрации фибриногена в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

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;
- коагулометр;
- дозатор пипеточный на 0,1 мл - 1,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- цилиндр мерный вместимостью 200 мл;
- 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 г) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

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.

Перед проведением анализа плазма разводится (точно!) буфером в 10 раз (0,2 мл плазмы + 1,8 мл трис-буфера).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

А. Разведение концентрированного буфера.

Содержимое одного флакона с концентрированным буфером трис-НСI перенести в мерный цилиндр и довести объем дистиллированной водой до 200 мл. В результате получают рабочий раствор буфера.

Б. Разведение тромбина.

В один флакон с тромбином внести (точно!) 5,0 мл растворителя для тромбина и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°C) и энергичном покачивании в течение 2 мин. В результате получают раствор тромбина. Тромбин во втором флаконе разводят по необходимости.

В. Разведение стандарт-плазмы и приготовление калибровочных растворов.

Во флакон со стандарт-плазмой внести (точно!) 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°C) и слабым покачивании в течение 3 мин. В результате получают стандарт-плазму с концентрацией фибриногена 2,50 г/л.

Разведенную стандарт-плазму делят на две равные части, одну из которых замораживают при температуре -16...-20°C (для возможного повторного приготовления калибровочных растворов), а вторую разводят в соответствии с приведенной ниже схемой:

Номер раствора	Стандарт-плазма и ее разведения (мл)	+ Буфер (мл)	Разведение	Концентрация фибриногена, г/л
1	0,2 мл	+ 0,8	1 : 5	5,00
2	0,5 мл раствора 1	+ 0,5	1 : 10	2,50
3	0,5 мл раствора 2	+ 0,5	1 : 20	1,25
4	0,5 мл раствора 3	+ 0,2	1 : 28	0,90

Примечание: для оптико-механического коагулометра CGL 2110 фирмы СОЛАР (Беларусь) раствор № 4 не применяется.

2. ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

1. В кювету коагулометра внести 0,2 мл раствора 1 (см. схему).
2. Инкубировать при температуре +37°C 1 мин.
3. В ту же кювету добавить 0,1 мл рабочего раствора тромбина, имеющего комнатную температуру (+18...+25°C) и начать отсчет времени свертывания.
4. Аналогично определить время свертывания со 2, 3 и 4 калибровочным раствором.
5. По полученным данным построить калибровочную кривую (см. рисунок), где по оси ординат отмечают время свертывания (сек), а по оси абсцисс - концентрацию фибриногена (г/л) в соответствии с приготовленными разведениями.

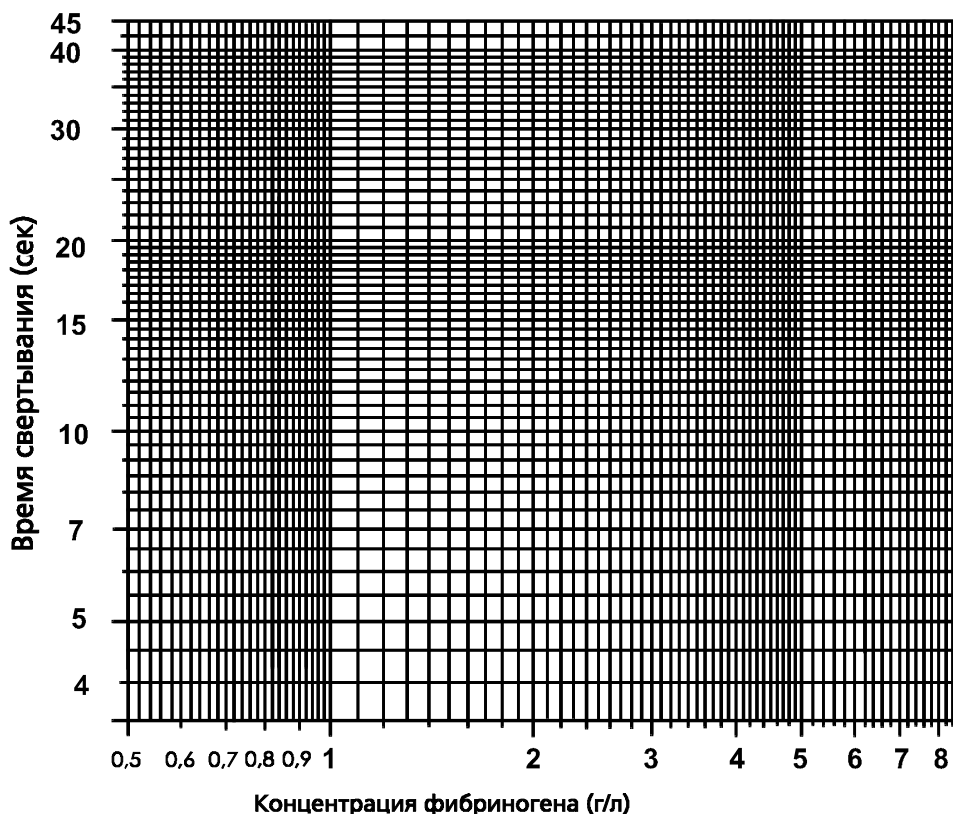


Рис. Координатная сетка и пример построения калибровочной кривой.

3. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. В кювету коагулометра внести 0,2 мл разведенной (см. раздел "Приготовление анализируемых образцов") исследуемой плазмы.
2. Инкубировать при температуре +37°C 1 мин.¹
3. В ту же кювету добавить 0,1 мл рабочего раствора тромбина, имеющего комнатную температуру (+18...+25°C) и начать отсчет времени свертывания.

4. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обычно время свертывания разведенной исследуемой плазмы составляет 4-40 с. По калибровочной кривой находят концентрацию фибриногена в исследуемом образце (в диапазоне 0,7-6,0 г/л для оптических коагулометров и 0,9-6,0 г/л для коагулометров, работающих на механическом принципе).

Для коагулометра CGL 2110 фирмы СОЛАР (Беларусь) диапазон измеряемых концентраций фибриногена в связи с конструктивными особенностями прибора составляет 1,2-5,0 г/л.

При определении концентрации фибриногена (в разведении плазмы 1+9), близкой к крайним значениям измеряемого диапазона (более 6,0 г/л или менее 0,9 г/л), рекомендуется повторить анализ с другим разведением исследуемого образца плазмы (соответственно 1+19 или 1+4). Далее, полученный по калибровочной кривой результат соответственно уменьшают или увеличивают в 2 раза.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на проведение 90 анализов при расходе раствора тромбина по 0,1 мл на 1 анализ.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности набора (18 мес.). Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Время использования набора не должно превышать 1 неделю с момента вскрытия его компонентов.

Раствор тромбина можно хранить при температуре +2...+8°C не более 3 дней; не замораживать.

Растворитель для тромбина после вскрытия флакона можно хранить при температуре +2...+8°C не более 1 недели; не замораживать.

Стандарт-плазму после разведения можно хранить при комнатной температуре +18...+25°C не более 3 ч или не более 1 недели при температуре -16...-20°C.

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре +2...+8°C не более 1 мес.

¹ Инкубацию проводят в термостате коагулометра