

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения концентрации фибриногена по методу Клаусса «МЛТ-ФИБРИНОГЕН»

1. Назначение

Набор предназначен для количественного определения фибриногена в плазме крови по методу Клаусса.

2. Принцип действия набора

Время свертывания разбавленной цитратной плазмы крови после добавления избытка тромбина пропорционально концентрации фибриногена.

3. Состав набора

1. Фибриноген-реагент (лиофилизированный бычий тромбин с активностью 30 МЕ/мл, содержащий инактиватор гепарина) – 8 флаконов.
2. Концентрат имидазольного буфера (концентрация 10:1, рН 7.3) – 1 флакон, 8 мл.
3. Суспензия каолина (1% раствор каолина) – 1 флакон.

Набор рассчитан на проведение 160 анализов при определении вручную и на коагулометрах с рабочим объемом кюветы 300 мкл, или 320 анализов при определении на коагулометрах с рабочим объемом кюветы 150 мкл.

4. Аналитические и диагностические характеристики

1. Диапазон линейности зависит от типа коагулометров. Для коагулометров ЭМКО он составляет от 1 до 6 г/л.
2. Коэффициент вариации результатов определения не превышает – 10%.
3. Допустимый разброс результатов определения в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии не превышает – 10%.

5. Меры предосторожности

Компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны. При работе с плазмой следует надевать одноразовые перчатки, так как образцы человеческой крови могут содержать возбудителей вирусных инфекций.

6. Оборудование и материалы

1. коагулометр;
2. пипетки для дозирования объемов от 10 до 100 мкл (или от 20 до 200 мкл, если рабочий объем кюветы составляет 300 мкл) и 2 мл (для растворения реактива);
3. пробирки пластиковые (если требуется предварительное разведение плазмы, или длительное ее хранение);
4. перчатки резиновые хирургические;
5. вода дистиллированная;
6. центрифуга лабораторная.

7. Приготовление анализируемых образцов крови

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую пробирку, содержащую 0,11 М раствор натрия лимоннокислого 3-х замещенного (3,2% раствор 2-водной соли, или 3,8% 5,5-водной соли). Соотношение объемов крови и цитрата натрия – 9:1. Кровь центрифугируют при 3000 об/мин (1200-1500 г) в течение 10 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы. Если анализ откладывается более чем на 2 часа, то плазму необходимо перенести в другую пробирку, которая может храниться в течение ра-

бочего дня при комнатной температуре, или в течение 1 месяца при -20°C. Замороженные образцы плазмы необходимо размораживать в термостате при + 37°C в течение 10 мин, затем аккуратно перемешать.

Не допускается анализ плазмы крови, имеющей сгустки !

8. Подготовка компонентов набора

1. Приготовление рабочего раствора буфера.

Развести концентрат имидазольного буфера дистиллированной водой в 10 раз (1 объем буфера + 9 дистиллированной воды).

2. Приготовление рабочего раствора фибриноген-реагента.

К содержимому флакона добавить **2,0** мл дистиллированной воды, аккуратно растворить вращением или покачиванием флакона (**не встряхивать !**), и выдержать при комнатной температуре (+18-+25°C) в течение 30 мин. При работе на оптическом коагулометре (АПГ2-02, АПГ2-02П, АПГ4-02П) для повышения точности и воспроизводимости результатов рекомендуется флакон с фибриноген-реагентом растворить в **1,0** мл дистиллированной воды и после полного растворения добавить **1,0** мл 1% суспензии каолина (перед внесением каолин встряхнуть). Во время работы содержимое флакона необходимо периодически перемешивать в связи с оседанием каолина.

9. Проведение анализа

Для коагулометров АПГ2-02, АПГ2-02П, АПГ4-02П:

Вариант I (рекомендуется при наличии дозатора с переменным объемом и одноразовых наконечников).

1. В кювету коагулометра внести **10 мкл** плазмы. Для обеспечения высокой точности пипетирования необходимо:

- ✓ после забора плазмы прикоснуться наконечником к стенке пробирки выше уровня плазмы. Это удаляет избыток вязкого раствора (плазмы) с поверхности наконечника.
- ✓ вносить плазму на боковую стенку кюветы коагулометра, перемещая наконечник в процессе выдувания по стенке кюветы вверх.

2. Добавить в кювету с плазмой **90 мкл** буфера.

3. Инкубировать (прогреть) в течение **60 сек.**

4. Внести в кювету **50 мкл** фибриноген-реагента комнатной температуры (18 – 25°C) и определить время образования сгустка.

<u>Внести в кювету коагулометра:</u>	<u>Объем</u>
Плазма исследуемая (или контрольная),	10 мкл
Рабочий раствор буфера	90 мкл
Инкубировать при +37°C – 60 сек	
Фибриноген-реагент (+18 – +25°C)	50 мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах	

Вариант II (с предварительным разведением плазмы) используется, если нет дозаторов с переменным объемом. Плазма разводится в 10 раз (например, 50 мкл плазмы + 450 мкл рабочего буфера).

Внимание!

Стабильность образцов после разведения снижается! При разведении в конических пробирках типа «Эппендорф» для перемешивания плазмы с буфером рекомендуется опустить наконечник пипетки до дна пробирки и перемешать многократным засасыванием и выдуванием (без «дожима») во избежание вспенивания образцов). Перемешивание на вортексе и переворачиванием пробирки повышает вероятность образования потенциально опасного аэрозоля!

100 мкл разведенной плазмы вносят в кювету коагулометра, предварительно прогретую при температуре + 37°C.

<i>Внести в кювету коагулометра:</i>	<i>Объем</i>
Плазма исследуемая (или контрольная), разведенная в 10 раз	100 мкл
Инкубировать при +37°C – 60 сек	
Фибриноген-реагент (+18-+25°C)	50 мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах	

Для коагулометров с рабочим объемом кюветы 0,3 мл:

<i>Внести в кювету(пробирку)</i>	<i>Объем</i>
Плазма исследуемая (или контрольная), разведенная в 10 раз	200 мкл
Инкубировать при +37°C – 60 сек	
Фибриноген-реагент (+18-+25°C)	100 мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах	

10. Результаты анализа

Концентрацию фибриногена определяют по калибровочному графику, который строят в координатах: логарифм времени свертывания в сек от логарифма концентрации фибриногена стандартной плазмы в г/л. Для каждой серии набора необходимо строить свою калибровку.

Для этого определяют время свертывания следующих разведений плазмы калибратора:

РАЗВЕДЕНИЕ	1:4	1:9	1:14	1:19	1:29*
Имидазоловый буфер, мкл	200	450	700	950	1450
Плазма-калибратор, мкл	50	50	50	50	50
коэффициент для расчета концентрации фибриногена при построении калибровочного графика	A x 2,0	A x 1,0	A x 0,65	A x 0,50	A x 0,33

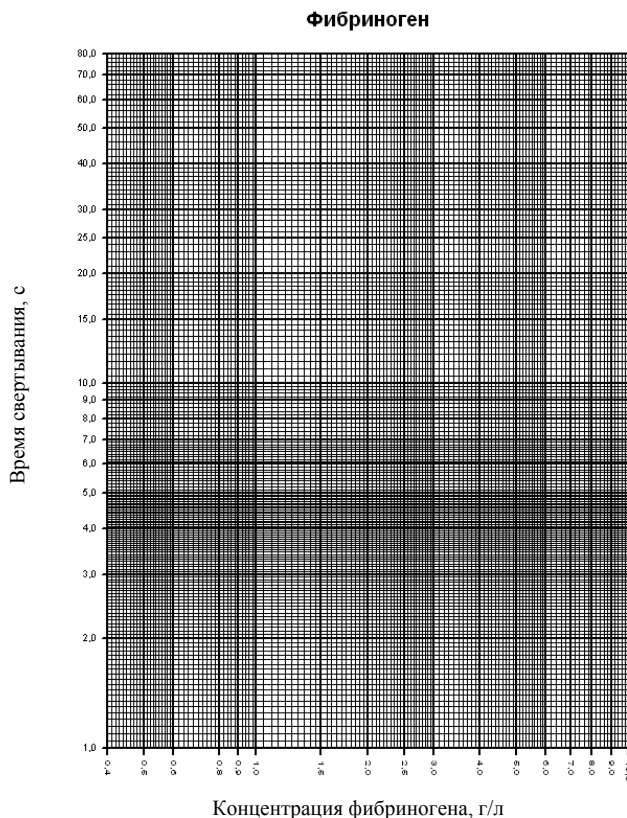
где А – аттестованное значение концентрации фибриногена в плазме калибратора.

* – если концентрация фибриногена в плазме калибратора <3,0 г/л, то разведение 1:29 не использовать.

При значительном отклонении концентрации фибриногена от нормы (время свертывания < 6,0 сек или > 30,0 сек) необходимо повторить определение с использованием разведений плазмы 1:19, либо 1:4 или 1:1. Полученный результат умножить на 2, 0,5 и 0,2 соответственно.

Нормальными значениями концентрации фибриногена принято считать 1,5 – 4,0 г/л. Превышение концентрации фибриногена >3,2 г/л связано с повышением риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Координатная сетка для построения калибровочного графика для определения концентрации фибриногена по Клауссу.



11. Условия хранения и эксплуатации

Срок годности – 12 месяцев.
Хранить набор при температуре +2-+8°C. Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 5 суток.
Рабочий раствор тромбин-реагента после растворения стабилен в течении 8 часов при комнатной температуре +18-+25°C; 2 суток при температуре +2-+8°C; Допускается однократное замораживание на 1 месяц при температуре -20°C.