

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
Реагента для определения протромбинового времени (Тромбопластин с кальцием) по ТУ 9398-028-05595541-2009

НАЗНАЧЕНИЕ

Тромбопластин с кальцием – лиофильно высушенный с ионами кальция водорастворимый реагент, полученный из мозга кроликов.

Реагент для определения протромбинового времени (Тромбопластин с кальцием) предназначен для определения протромбинового времени (ПВ) в плазме венозной крови и расчета протромбинового отношения (ПО) и протромбинового индекса (ПИ), а также для определения протромбина по Квику в % от нормы.

Определение протромбинового времени - это высокочувствительный и простой скрининговый тест, который выявляет нарушения факторов внешнего пути свертывания крови (ф. II, V, VII и X) и рекомендуется для:

- диагностики наследственных и приобретенных коагулопатий;
- диагностики заболеваний печени.

Тромбопластин с кальцием предназначен для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров и ручным методом.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора:

Тромбопластин с кальцием, 8 мл/флакон – 10 флаконов.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор код ПГ-4/1 предназначен для проведения 800 анализов при расходе 100 мкл тромбопластина с кальцием на один анализ или 400 анализов при расходе 200 мкл тромбопластина с кальцием на один анализ.

Принцип метода. При добавлении к цитратной плазме избытка тканевого тромбопластина и ионов кальция время образования сгустка фибрина зависит только от активности факторов внешнего и общего пути коагуляции: I, II, V, VII, X. Определяется время от момента добавления к исследуемой плазме тромбопластина с кальцием до момента образования сгустка фибрина.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения протромбинового времени: билирубин в концентрации до 30 мг/л, свободный гемоглобин – до 100 мг/л, триглицериды – до 6 г/л и нефракционированный гепарин – до 0,6 МЕ/мл. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно завышенных результатов определения протромбинового времени. Присутствие волчаночного антикоагулянта и низкий (менее 1 г/л) уровень фибриногена в исследуемой плазме также может приводить к получению ложно завышенных результатов.

Чувствительность

В зависимости от чувствительности коагулометра Тромбопластин с кальцием позволяет определить протромбин по Квику до 12,5%.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения протромбинового времени - не более 10%. Допустимый разброс результатов определения протромбинового времени в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Линейность

Линейность определения протромбина по Квику от 12,5 до 100%.

Значения, соответствующие нормальным

Протромбиновое время, сек	12 – 18
МНО	0,85 – 1,15
Протромбин по Квику в % от нормы	70 – 130
ПИ, %	90 – 105

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

При работе с реагентом Тромбопластин с кальцием и с исследуемыми образцами крови пациентов следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3.2630-10 от 30.09.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5.2826 от 11.01.2011). При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, т.к. образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, позволяющие отобрать 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- термобаня на 37°C и секундомер (для ручного определения);
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл;
- 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- Плазма-калибратор для определения МНО и протромбина по Квику (Протромбин-калибратор);
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор (0,9% раствор натрия хлорида);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор Тромбопластин с кальцием предназначен для определения протромбинового времени в плазме человеческой крови.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянкой поверхностью.

Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) 5,5-водным цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) 2-водным цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°C в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 г).

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 8 ч при комнатной температуре. Для данного анализа не допускается хранение образцов биологического материала при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в связи с возможностью холодной активации фактора VII.

Ограничения по использованию биологического материала

При работе с кровью общим правилом является немедленное отделение плазмы от форменных элементов, так как некоторые вещества могут поглощаться и инактивироваться эритроцитами и лейкоцитами.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во флакон с Тромбопластином с кальцием внести 8 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при покачивании. Перед проведением анализа прогреть полученную тромбопластин-кальциевую смесь (ТКС) при 37°C в течение 30 мин.

Приготовление раствора Протромбин-калибратора

Внести во флакон с Протромбин-калибратором 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании (избегать образования пены). Перед использованием раствор Протромбин-калибратора нужно выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения протромбинового времени.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу измерения.
- Считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом на термобане

Внести в кювету анализатора или в пробирку на термобане:	Объем, мкл
Исследуемая плазма (Протромбин-калибратор или Протромбин-контроль)	50
Инкубировать при 37°C точно 1 или 2 минуты.	
Тромбопластин-кальциевая смесь	100

Регистрация результатов

Измерить ПВ в исследуемой плазме от момента добавления ТКС до момента образования фибринового сгустка.

РАСЧЕТЫ

Результаты протромбинового теста могут быть выражены как:

- Протромбин по Квику в % от нормы;
- Протромбиновое отношение;
- Протромбиновый индекс, %.

Протромбиновое отношение (ПО) вычислить по формуле:

$$ПО_{П} = \frac{ПВ_{П}}{ПВ_{100\%}}$$

$ПВ_{100\%}$ – среднее нормальное протромбиновое время, в секундах.

$ПВ_{П}$ – ПВ исследуемой плазмы пациента, сек.

Так как

$$ПО_{ПК} = \frac{ПВ_{ПК}}{ПВ_{100\%}} \quad \text{то} \quad ПВ_{100\%} = \frac{ПВ_{ПК}}{ПО_{ПК}} \quad ПО = \frac{ПВ_{П}}{ПВ_{ПК}} \times ПО_{ПК},$$

где: $ПВ_{ПК}$ – ПВ Протромбин-калибратора, сек.

$ПО_{ПК}$ – протромбиновое отношение Протромбин-калибратора (указано в паспорте на Протромбин-калибратор).

Протромбиновый индекс (ПИ) вычислить по формуле:

$$ПИ = \frac{ПВ_{100\%}}{ПВ_{П}} \times 100\%, \quad \text{или} \quad ПИ_{П} = \frac{ПВ_{ПК}}{ПВ_{П}} \times ПИ_{ПК}, \quad \text{где}$$

$ПИ_{К}$ – протромбиновый индекс Протромбин-калибратора (указан в паспорте на плазму, не входит в состав набора).

Построение калибровочного графика для определения протромбина по Квику

Приготовить ряд разведений Протромбин-калибратора физиологическим раствором по следующей схеме.

Протромбин по Квику в Протромбин-калибраторе в %	A*%	0,5 A%	0,25 A%
Протромбин-калибратор, мл	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор, мл	-	0,5	1,5

*A – аттестованное значение протромбина по Квику (в % от нормы) в Протромбин-калибраторе.

Протромбин по Квику в % от нормы в плазме пациента определить по калибровочному графику, построенному с использованием разных разведений Протромбин-калибратора.

Для каждого разведения Протромбин-калибратора определить протромбиновое время (ПВ), сек, и нанести полученные значения на координатную сетку (скачать с сайта www.renam.ru). Построить калибровочный график зависимости ПВ, сек, (ось X) от Протромбина по Квику, %, (ось Y).

Определение протромбина по Квику в плазме пациента

Определить ПВ в исследуемых образцах и по графику рассчитать протромбин по Квику. Образцы с высоким уровнем Протромбина по Квику могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности Протромбина по Квику для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы физиологическим раствором в 2 раза. При этом результат, полученный по калибровочному графику, умножить на 2.

Для удобства работы на график нанесена также вторая ось (Y) с величинами, обратными значению протромбина (1/протромбин в %) и таблица пересчета обратных величин.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Удлинение протромбинового времени может быть связано с:

- дефицитом факторов внешнего пути свертывания (II, V, VII, X);
- дефицитом витамина K;
- приемом антикоагулянтов непрямого действия (например, варфарина, синкумара и др.);
- ДВС-синдромом (фаза гипокоагуляции);
- афибриногемией, гипофибриногемией, дисфибриногемией;
- заболеванием печени;
- антикоагулянтами прямого действия (гепарин);
- злокачественными опухолями.

Укорочение протромбинового времени свидетельствует об:

- активации внешнего пути свертывания и гиперкоагуляции;
- повышении активности факторов внешнего пути свертывания;
- ДВС-синдроме;
- активации системы фибринолиза.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения протромбина по Квику и ПО следует контролировать с помощью набора Протромбин-контроль, код КМ-17 или Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н, код КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укупоренном виде при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Приготовленные растворы следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность тромбопластин-кальциевой смеси (ТКС).

+37°C	+18-25°C	+2-8°C
8 часов	8 часов	5 суток

Транспортирование наборов должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°C не более 10 сут. Замораживание набора Тромбопластин с кальцием допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие реагента Тромбопластин с кальцием требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН № 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с Тромбопластинком с кальцием с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на ¾, завязывают, маркируют надписью: «Отходы. Класс Б», наносят на бирку название организации, дату и ФИО исполнителя и помещают на участок временного хранения до вывоза транспортом специального подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., «НьюДиамед», 2001. - 285 с.
2. Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.С., Козлов А.А. Внешний путь свертывания крови. Методы исследования. М. 2016. - 73 с.
3. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000. - 360 с.
4. Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. Am J Med Sci. 1935;190:501-11.
5. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Report Series 1999; No. 889: 64-93.
6. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, et al. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists. Chest. 2008; 133:160S-198S.
7. Poller L. The prothrombin time. WHO/LAB/98.3. 1998.
8. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, et al. Laboratory control of oral anti-coagulant treatment by the INR system in patients with the antiphospholipid syndrome and lupus anticoagulant. Results of a collaborative study involving nine commercial thromboplastins. Br J Haematol. 2001;115:672-8.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2. тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru.