

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Реагента для определения протромбинового времени (Тромбопластин) и Набора реагентов для определения протромбинового времени (Диагем П)

НАЗНАЧЕНИЕ

Тромбопластин – лиофильно высушенный водорастворимый реагент, полученный из мозга кроликов.

Реагента для определения протромбинового времени (Тромбопластин) и Набора реагентов для определения протромбинового времени (Диагем П) предназначены для определения протромбинового времени (ПВ) в плазме венозной крови и расчета протромбинового отношения (ПО), протромбинового индекса (ПИ) и Международного Нормализованного Отношения (МНО), 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:

- мониторинга терапии непрямыми антикоагулянтами;
- диагностики наследственных и приобретенных коагулопатий;
- диагностики заболеваний печени.

Тромбопластин и Диагем П предназначен для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров и ручным методом.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ

Состав наборов:

Тромбопластин - 10 флаконов	код ПГ-1
Тромбопластин - 3 флакона	код ПГ-1/1
Диагем П	код ПГ-2

Тромбопластин - 6 флаконов;
0,025М раствор кальция хлорида (5 мл) - 4 флакона.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор код ПГ-1 предназначен для проведения 500 анализов при расходе 100 мкл тромбопластина на один анализ или 250 анализов при расходе 200 мкл тромбопластина на один анализ.

Один набор код ПГ-1/1 предназначен для проведения 150 анализов при расходе 100 мкл тромбопластина на один анализ или 75 анализов при расходе 200 мкл тромбопластина на один анализ.

Один набор код ПГ-2 предназначен для проведения 300 анализов при расходе 100 мкл тромбопластина на один анализ или 150 анализов при расходе 200 мкл тромбопластина 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 смеси тромбопластина и ионов кальция до момента образования сгустка фибрина.

ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ РЕАГЕНТУ

Каждая серия Тромбопластина стандартизована против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 5-го Международного Стандарта кроличьего тромбопластина, код RBT/05, полученного из NIBSC. Стандартизация осуществляется по процедуре, утвержденной ВОЗ с использованием плазм-калибраторов, полученных лечебным плазмаферезом у пациентов с анти-витамином К антикоагулянтной терапией. МИЧ каждой серии Ренампластина указан в паспорте на реагент.

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 позволяет определить протромбин по Квику до 12,5%.

Воспроизводимость

Допустимое отклонение Международного Индекса Чувствительности (МИЧ) Тромбопластина от аттестованного значения – не более 10%. 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 Тромбопластином и набором Диагем П 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

Наборы Тромбопластин и Диагем П предназначены 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 стекляннной 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 (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

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 2-8°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 внести 2,5 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.

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.
- Читать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом на термобане

Внести в кювету анализатора или в пробирку на термобане:	Объем, мкл
Протромбин-калибратор (Протромбин-контроль или исследуемая плазма)	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:

- МНО (Международное Нормализованное Отношение);
- 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).

Международное Нормализованное Отношение (МНО) вычислить по формуле:

$$МНО = \left(\frac{ПВ_{п}}{ПВ_{100\%}} \right)^{МИЧ} \quad \text{или} \quad МНО = \left(\frac{ПВ_{п}}{ПВ_{пк}} \times ПО_{пк} \right)^{МИЧ}$$

МИЧ – Международный Индекс Чувствительности Тромбопластина, указан в прилагаемом паспорте.

Таблица пересчета ПО в МНО приведена в прилагаемом паспорте на данную серию Тромбопластина.

Протромбиновый индекс (ПИ) вычислить по формуле:

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

$ПИ_{пк}$ – протромбиновый индекс Протромбин-калибратора (указано 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 ($1/\text{протромбин}$ 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);
 - афибриногенемией, гипофибриногенемией, дисфибриногенемией;
 - 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 МНО следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н, код КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности наборов – 12 месяца. Наборы стабильны в течение всего срока годности реагентов при условии хранения в закупоренном виде при температуре 2-8°C. Приготовленные растворы следует хранить в плотно закупоренном 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 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание набора Диагем П не допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие реагента Тромбопластин и набора Диагем П 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 Тромбопластином и набором Диагем П с использованным образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б. Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на $\frac{3}{4}$, 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, Stanly-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.

Таблица пересчета значений % протромбина в 1/%протромбина

% протромбина по Квику	10	12,5	13,2	13,9	14,7	15,2	15,6	16,1	16,7	17,2	17,9	18,5	19,2	20	21	22	23	24	25
1/%протромбина по Квику	0,1	0,08	0,076	0,072	0,068	0,066	0,064	0,062	0,060	0,058	0,056	0,054	0,052	0,05	0,048	0,046	0,044	0,042	0,04
% протромбина по Квику	25,5	26,5	27	28	28,5	29,5	30,5	31,5	32,5	33,5	34,5	35,5	40	45,5	50	63	71	83	100
1/%протромбина по Квику	0,039	0,038	0,037	0,036	0,035	0,034	0,033	0,032	0,031	0,030	0,029	0,028	0,025	0,022	0,020	0,016	0,014	0,012	0,01

