

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения тромбинового времени (Тромбин-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения тромбинового времени (Тромбин-тест) предназначен для оценки конечного этапа свертывания крови, т.е. скорости превращения фибриногена в фибрин. Определение тромбинового времени используется для определения функциональной активности фибриногена, для контроля за гепаринотерапией и фибринолитической терапией, для диагностики активации фибринолиза.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

Тромбин для определения тромбинового времени - 2 флакона.
Стабилизатор (этиленгликоль) - 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

При расходе 100 мкл тромбина на один анализ набор предназначен для проведения:

не менее 150 анализов с тромбином активностью 9МЕ/мл или
не менее 200 анализов с тромбином активностью 6МЕ/мл или
не менее 400 анализов с тромбином активностью 3МЕ/мл.

Принцип метода. Метод основан на определении времени образования фибринового сгустка при добавлении к плазме раствора тромбина необходимой активности.

ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ РЕАГЕНТУ

Активность каждой серии тромбина аттестуется против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 2-го Международного стандарта тромбина, код 01/580, полученного из NIBSC.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определение АЧТВ: билирубин в концентрации до 20 мг/л; гемоглобин (свободный) – до 500 мг/л; триглицериды – до 1,2 г/л.

Результаты определения тромбинового времени могут зависеть от назначаемых препаратов. Препараты дифенина, гепарина, гирудина и других прямых ингибиторов тромбина могут повышать тромбиновое время.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения тромбинового времени в одной пробе плазмы одним набором не превышает 10%. Коэффициент вариации результатов определения тромбинового времени в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Значения, соответствующие нормальным

Нормальная область времени свертывания составляет:

- при активности тромбина 9 МЕ/мл - 7–9 сек.
- при активности тромбина 6 МЕ/мл - 9–12 сек;
- при активности тромбина 3 МЕ/мл - 15–20 сек;

Пределы времени свертывания в контрольной плазме с активностью тромбина 3, 6 и 9 МЕ/мл указаны в паспорте на набор.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе с набором Тромбин-тест 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, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- термобаня на 37°C и секундомер (для ручного определения);
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 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);
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор (0,9% раствор натрия хлорида);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов Тромбин-тест предназначен для определения тромбинового времени в плазме человеческой крови.

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

Процедура получения биологического материала

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

Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками и замораживают при температуре не выше -20°C.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре (18-25°C) и не более 8 ч при температуре 2-8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

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.

Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стабилизированный раствор тромбина

Тромбин человека, лиофильно высушенный с активностью около 100 МЕ/мл. Внести во флакон с лиофильно высушенным тромбином 1,0 мл дистиллированной воды и 0,2 мл стабилизатора, растворить содержимое при осторожном покачивании.

Рабочий раствор тромбина

В зависимости от необходимой активности приготовить рабочий раствор тромбина по следующей схеме:

Активность МЕ/мл	Разведение стабилизированного раствора тромбина, в раз	Количество стабилизированного раствора тромбина, мл	Количество физиологического раствора, мл
9	7	0,1	0,6
6	10	0,1	0,9
3	20	0,1	1,9

Рабочий раствор тромбина готов к проведению анализа через 15 мин после приготовления. Рабочий раствор тромбина перед анализом не прогревать при температуре 37°C.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения тромбинового 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
Плазма исследуемая (контрольная)	100
Инкубировать при температуре 37°C точно 2 мин.	
Рабочий раствор тромбина	100

Регистрация результатов

В процессе измерения тромбинового времени зарегистрировать время от момента добавления к цитратной плазме тромбина до момента образования сгустка.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерения тромбинового времени пациента должны включаться в отчет как «ТВ в секундах». Эти результаты должны соотноситься с нормальным диапазоном значений тромбинового времени, принятым в лаборатории для данного реагента, который также должен быть включен в отчет.

Значения тромбинового времени контрольной плазмы никогда не должны использоваться в качестве нормального диапазона.

Все рабочие растворы тромбина чувствительны к присутствию гепарина в исследуемой плазме, для мониторинга за введением гепарина рекомендуется использовать тромбин с активностью 9 МЕ/мл.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тромбиновое время не зависит от внешней и внутренней систем активации, но зависит от аномального фибриногена, от концентрации фибриногена, от активности антитромбинов, процессов полимеризации и стабилизации фибрина.

Укорочение тромбинового времени наблюдается при гиперфибриногенемии (концентрация фибриногена более 6 г/л).

Удлинение тромбинового времени наблюдается при гипо- и дисфибриногенемиях; гепаринотерапии; наличии ингибиторов полимеризации фибрина (парапротеинов, продуктов деградации фибрина/фибриногена и др.); тромболитической терапии (например, при применении урокиназы, стрептокиназы).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения тромбинового времени следует контролировать с помощью 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 реагентов при условии хранения в закупоренном виде при температуре 2-8°C. Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно закупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Стабилизированный раствор тромбина можно хранить при температуре 2-8°C не более 2 недель, при -18°C - 2 месяца. Не рекомендуется повторное замораживание реагента.

Активность МЕ/мл	2-8°C	18-22°C	-18-20°C*
9	3 сут	1 сут	2 мес.
6	3 сут	1 сут	2 мес.
3	3 сут	1 сут	2 мес.

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 суток. Замораживание наборов допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Тромбин-тест 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 набором реагентов Тромбин-тест с использованием 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., Простакова Т.М., Мелкумян А.Л., Суворов А.В. Скрининговые тесты плазменного гемостаза. Методы исследования. М. 2016.- 70 с.
3. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000.- 360 с.
4. Biggs R. Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis. 2nd Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1976: 722.
5. Sirridge MS. Laboratory evaluation of hemostasis. 2nd Ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1974: 148.

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.

