

УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2010 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент
МБООИ «Общество больных
гемобилией»
 Ю.А. Жулев
 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для определения
протромбинового времени
(Диагем П).

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Диагем П - простой скрининговый тест, предназначенный для определения протромбинового времени в плазме крови человека с целью диагностики нарушений во внешней системе коагуляции, включающей факторы протромбинового комплекса (II, V, VII, X).

Один набор предназначен для проведения 150 макро- или 300 микро-анализов при расходе по 0,2 мл или 0,1 мл тромбопластин-кальциевой смеси (ТКС) на одно определение, соответственно.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Определяется время свертывания бедной тромбоцитами цитратной плазмы в присутствии ионов кальция и избытка тканевого тромбопластина. В этих условиях время образования сгустка фибрина зависит только от активности факторов протромбинового комплекса (факторов внешнего пути коагуляции). Измеряют время от момента добавления к плазме тромбопластина с кальцием до момента образования фибринового сгустка.

2.2. Состав набора

- тромбопластин из мозга кролика, лиофильно высушенный - 6 флаконов;
- 0,025 М раствор кальция хлористого – 4 флакона (по 5,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор разработан для тестирования *in vitro* первого этапа внешнего пути процесса свертывания крови, в котором функцию тканевого фактора и фосфолипидов несет лиофилизированный экстракт мозговой ткани кролика (тромбопластин). При добавлении к исследуемой плазме крови человека

тромбопластина и кальция хлористого образуется сгусток фибрина, время образования которого зависит от активности содержащихся в плазме факторов свертывания крови (II, V, VII, X). Реакция стандартизуется проведением процесса при постоянной температуре (37°C).

Коэффициент вариации результатов определений - не более 10%.

Продолжительность протромбинового времени в контрольной нормальной плазме с установленной активностью протромбина - в пределах 12-18 сек, допустимое отклонение от аттестованного значения - не более 10%.

Чувствительность тромбопластина - не менее 12,5 %.

Отклонение от "линейности" при определении протромбина в диапазоне разведений контрольной нормальной плазмы от 100 до 25 % - не более 10%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- Коагулометр с набором пластиковых кювет;
- пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,1; 0,2; 1,0 мл;
- пробирки стеклянные силиконизированные или пластиковые вместимостью 10 мл;
- вода дистиллированная;
- 38% раствор натрия лимоннокислого (цитрата);
- контрольная нормальная плазма, бедная тромбоцитами, с аттестованной активностью протромбина по Квику;
- 0,9% раствор натрия хлористого;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Приготовить 3,8% раствор цитрата разведением в 10 раз концентрированного 38% раствора.

Венозную кровь отобрать в силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку на 3,8% (0,11 моль/л) цитрате натрия в соотношении 9:1, центрифугировать в течение 7 мин при 1000 об/мин (240 g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Время хранения образцов плазмы при комнатной температуре (18-25°C) - не более 4 ч; не допускается хранение образцов при температуре 2-8°C в связи с возможностью холодовой активации фактора VII. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 20°C.

Клинико-диагностическим лабораториям, использующим в качестве контроля свежий пул донорской плазмы, имеющий 100% активность протромбина, пул донорской плазмы из каждой дозы крови приготовить аналогичным образом путем двойного центрифугирования.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

7.1. Приготовление тромбопластин-кальцевой смеси (ТКС)

В один флакон с тромбопластином внести 2,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при покачивании. Внести в тот же флакон равное количество 0,025 М раствора кальция хлористого. Перед проведением анализа ТКС прогреть при температуре 37°C в течение 30 мин.

7.2. Стабильность ТКС

Температура	37°C	18-25°C	2-8°C	Минус 18-20°C
Время хранения	8 ч	8 ч	5 сут	3 мес

7.3. Ход анализа

Внести в кювету коагулометра:		Объем
Плазма исследуемая (контрольная)		0,1 мл
Инкубировать при температуре 37°C точно 2 мин.		
ТКС		0,2 мл
Зафиксировать время свертывания, сек.		

7.4. Чувствительность к гепарину

Набор можно использовать при гепаринотерапии, если содержание гепарина в крови не превышает 1,0 МЕ/мл.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрируют время свертывания исследуемой плазмы, сек, после добавления раствора ТКС

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Полученные результаты определения протромбинового времени, сек, принято представлять в виде протромбинового отношения (ПО), протромбинового индекса (ПИ), протромбина в % от нормы по Квику.

9.1. Протромбиновое Отношение (ПО).

$$ПО = \frac{ПВ_Б}{ПВ_{100\%}},$$

где: $ПВ_Б$ – протромбиновое время плазмы крови пациента, сек.

$ПВ_{100\%}$ – протромбиновое время 100% свежего пула донорской плазмы, сек.

Клинико-диагностическим лабораториям рекомендуется использовать для определения значения $ПВ_{100\%}$ контрольную плазму НПО РЕНАМ. При этом значение $ПВ_{100\%}$ рассчитать по формуле:

$$ПВ_{100\%} = \frac{ПВ_К}{ПО_К},$$

где: $ПВ_К$ – протромбиновое время контрольной плазмы (определить одновременно с исследуемым образцом).

$ПО_К$ – протромбиновое отношение контрольной плазмы (указано в паспорте на плазму, не входит в состав набора).

Значение $ПВ_{100\%}$ рекомендуется внести в компьютеры современных моделей коагулометров для автоматического расчета ПО.

9.2. Протромбиновый индекс (ПИ).

$$ПИ_П = \frac{ПВ_{100\%}}{ПВ_П} \times 100\%,$$

где: $ПВ_{100\%}$ – протромбиновое время 100% свежего пула донорской плазмы, сек.

$ПВ_П$ – протромбиновое время плазмы пациента, сек.

9.3. Протромбин в % от нормы по Квику.

Приготовить ряд разведений контрольной нормальной плазмы в 0,9% растворе натрия хлористого по следующей схеме:

Протромбин по Квику в контрольной плазме, %	A*%	0,5 A%	0,25 A%
Контрольная плазма	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
0,9% раствор натрия хлористого	-	0,5 мл	1,5 мл

*А – аттестованное значение протромбина по Квику (%) в контрольной плазме, указано в паспорте на плазму.

Для каждого разведения контрольной нормальной плазмы определить ПВ, сек, и нанести полученные значения на горизонтальную ось абсцисс (X). На вертикальную ось ординат (Y) нанести значения активности протромбина по Квику, %. Построить калибровочный график зависимости ПВ от активности протромбина по Квику, %. Затем по графику определить ПВ в исследуемых образцах в % от нормы по Квику.

Образцы с высокой активностью 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 0,9% раствором натрия хлористого в 2 раза. Результат, полученный по калибровочному графику, умножить на 2.

Для удобства работы на график нанести вторую ось (Y) с величинами, обратными значению протромбина (1/протромбин, %) и таблицу пересчета обратных величин.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение набора должно проводиться при температуре 2-8° С в течение всего срока годности набора - 12 мес. Допускается хранение набора при температуре до 25° С в течение 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

ТКС, не подвергавшуюся прогреву, можно хранить при комнатной температуре (18-25°С) и температуре 37°С не более 8 ч, при температуре 2-8°С не более 5 сут или при температуре минус 18-20°С не более 3 мес.

Плазму, отделенную немедленно после взятия крови, следует анализировать не позднее 4 ч после сбора крови.

Раствор кальция хлористого после вскрытия флаконов можно хранить в хорошо укупоренном виде при температуре 2-8° С до окончания срока годности.

По вопросам, касающимся качества набора Диагем П, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу:

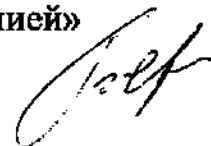
125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а, Гематологический научный центр РАМН, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: renam@blood.ru
и в Лабораторный Центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117241, г. Москва, Научный проезд, д. 14 а, тел.: (499) 120-60-96.

Заведующий отделом производства НПО «РЕНАМ»

МБООИ «Общество больных гемофилией»

кандидат биологических наук



А.Л.Берковский

Научный руководитель лаборатории

клинической коагулологии

ГНЦ РАМН

доктор медицинских наук



С.А.Васильев