

УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2010 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент
МБООИ «Общество больных
гемофилией»

Ю.А. Жулев
 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для определения тромбинового времени
(Тромбин-тест).

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Тромбин-тест предназначен для определения тромбинового времени, одного из основных показателей коагулограммы, характеризующего конечный этап свертывания крови (тромбин-фибриноген-фибрин) и проводимого с целью дифференциальной диагностики коагулопатий, связанных с ингибированием активности тромбина, снижением уровня фибриногена ниже 1,0 г/л, с недостаточностью процесса полимеризации фибрина и для наблюдения за результатами проводимого лечения (гепаринотерапия, введение стрептокиназы и т.п.).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В условиях добавления тромбина к цитратной плазме крови время свертывания зависит от количества и структуры фибриногена в данной плазме и от наличия ингибиторов реакции фибриноген-тромбин.

2.2. Состав комплекта реагента

- 2 флакона с лиофильно высушенным тромбином человека;
- 1 флакон с раствором стабилизатора - этиленгликолем (1,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ

Тромбиновое время характеризует конечный этап свертывания, т.е. скорость превращения фибриногена в фибрин. Тромбиновое время используют для определения функциональной активности фибриногена и ингибиторов тромбина в плазме, таких как:

- продукты деградации фибрина/фибриногена;
- гепарин и гепариноиды;
- при фибринолитической терапии.

Аномальное тромбиновое время встречается в случаях гипофибриногемии, афибриногемии или дисфибриногемии.

Смирнова
15.03.10 г.

Главный компонент реакции - тромбин - выделяют из крови в высокоочищенном виде с высокой удельной активностью, используя современные методы ионообменной хроматографии и ультрафильтрации. Для удобства работы к раствору тромбина добавляют стабилизатор этиленгликоль.

Тромбиновое время в контрольной нормальной плазме составляет 9-12 сек при активности тромбина 6 МЕ/мл и 15-20 сек при активности тромбина 3 МЕ/мл. Коэффициент вариации при определении тромбинового времени - не более 10%, допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии - 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 плазмы 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;
- центрифуга лабораторная медицинская, развивающая ускорение 1500 g;
- 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 тромбина;
- 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 силиконизированную 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.

Для анализов достаточно 1,0 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения плазмы при комнатной температуре (18-25°C) - не более 4 ч, при температуре 2-8°C - не более 8 ч. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

7.1. Приготовление реагентов

Стабилизированный раствор тромбина. Внести в один флакон с лиофильно высушенным тромбином 1,0 мл дистиллированной воды и 0,2 мл стабилизатора, растворить содержимое при осторожном покачивании.

Хранить при температуре 2-8°C не более 2 недель или при температуре минус 18-20°C – не более 2 мес.

Рабочий раствор тромбина.

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

Активность тромбина, МЕ/мл	Разведение стабилизированного раствора тромбина, в раз	Количество стабилизированного раствора тромбина, мл	Количество физиологического раствора, мл
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 проведением анализа не прогревать при температуре 37°C !

7.2. Стабильность.

Активность тромбина МЕ/мл	2-8°C	18-25°C	Минус 18-20°C*
6	3 сут	1 сут	2 мес
3	3 сут	1 сут	2 мес

*повторно не замораживать.

7.3. Чувствительность тромбина к гепарину

Рабочие растворы тромбина с активностью 3 и 6 МЕ/мл чувствительны к присутствию гепарина в исследуемой плазме, что позволяет проводить с данными реагентами мониторинг за введением гепарина.

7.4. Проведение анализа

Использовать только пластиковые или силиконизированные стеклянные пробирки.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (контрольная)	100 мкл
Инкубировать при температуре 37°C точно 2 мин.	
Рабочий раствор тромбина	100 мкл
Зафиксировать время свертывания, сек, на коагулологическом анализаторе.	

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрируют время свертывания исследуемой плазмы, сек, после добавления раствора тромбина.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Полученные результаты определения времени свертывания, сек, принято представлять в виде тромбинового времени, сек.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение набора должно проводиться при температуре 2-8° С в течение всего срока годности - 24 мес. Допускается хранение набора при температуре до 25° С не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

Рабочий раствор тромбина можно хранить при комнатной температуре (18-25° С) не более 1 сут, при температуре 2-8° С не более 3 сут или при температуре минус 18-20°С не более 2 мес.

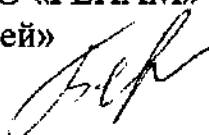
Плазму, отделенную немедленно после взятия крови, анализировать в не позднее 4 ч после сбора крови.

По вопросам, касающимся качества набора Тромбин-тест, 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, 120-60-95.

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