

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинских изделий для диагностики in vitro Реагента для определения протромбинового времени (Тромбопластин) по ТУ 9398-038-05595541-2011 и Набора реагентов для определения протромбинового времени (Диagem П) ТУ 9398-030-05595541-2010

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинские изделия для диагностики in vitro Реагент для определения протромбинового времени (Тромбопластин) по ТУ 9398-038-05595541-2011 и Набор реагентов для определения протромбинового времени (Диagem П) по ТУ 9398-030-05595541-2010 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.

Реагенты предназначены для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров и ручным методом.

Область применения. Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

Предназначенный пользователь. Определение протромбинового времени с помощью реагента Тромбопластин и набора Диagem П может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Наборы предназначены только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль. Определение протромбинового времени - это высокочувствительный 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.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРОВ**Состав наборов:**

Тромбопластин - Диagem П	2,5 мл/флакон	10 флаконов	код ПГ-1 код ПГ-2
Тромбопластин - 0,025M раствор кальция хлорида	2,5 мл/флакон 5 мл/флакон	6 флаконов; 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.

Один набор код ПГ-2 предназначен для проведения 300 анализов при расходе 100 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 Тромбопластина 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 вольчаночного 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

Наборы реагентов предназначены только для диагностики in vitro. Потенциальный риск применения наборов – класс 2а.

Наборы реагентов не являются источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с реагентом Тромбопластин, набором Диagem 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.

В состав реагента Тромбопластин входит экстракт мозга кроликов, являющегося потенциально инфицированным биологическим материалом. Безопасность каждой партии биологического материала подтверждается ветеринарным сертификатом изготовителя мозга кроликов. Тем не менее, не следует исключать остаточного минимального риска при работе с реагентом.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- пилетки 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 M);
- 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**

Реагент Тромбопластин и набор Диagem 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 стеклянной 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 от плюс 18 до плюс 25°C. 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 внести 2,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при покачивании. Внести в тот же флакон 2,5 мл 0,025 M раствора кальция хлористого. Перед проведением анализа прогреть полученную тромбопластин-кальциевую смесь (ТКС) при плюс 37°C в течении 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.
- 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:

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

$ПИ_{К}$ – 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/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 (дабигатран, ривароксабан, аписксабан);
- 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 набора Протромбин-контроль, код КМ-17 или Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н, код КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности наборов – 12 месяца. Не использовать наборы после истечения срока годности!

Наборы стабильны в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Замораживание реагента Тромбопластин допускается, замораживание набора Диагем П не допускается. Приготовленную тромбопластин-кальциевую смесь следует хранить в плотно укупоренном виде.

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 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 с набором Диагем П с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на ¾, завязывают, маркируют надпись: «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. Наборы Тромбопластин и Диагем П, не подлежащие использованию, и с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г») в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного). Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Номер по каталогу
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Биологический риск
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

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 anticoagulant 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