

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения протромбинового времени

Техпластин-тест

на 40 и 100 определений

НАЗНАЧЕНИЕ

Техпластин-тест предназначен для оценки протромбинового времени свертывания. Измерение проводят на коагулометре или мануально. Определение протромбинового времени используется для тестирования факторов протромбинового комплекса (II - протромбина, V, VII, X) и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Тромбопластин (фактор III, тромбокиназа) превращает протромбин плазмы крови в присутствии ионов кальция в активный фермент тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин. Измеряется протромбиновое время - время образования фибрина в плазме крови в присутствии ионов кальция и тканевого тромбопластина (растворимого экстракта из мозга человека).

Состав набора

на 40 определений

1. *Техпластин* - лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь, на 2,0 мл суспензии (10 определений) - 4 фл.

Международный индекс чувствительности (МИЧ) Техпластина в разных сериях составляет 1.1 или 1.2¹.

2. *Контрольная плазма* - лиофильно высушенный пул плазмы крови не менее, чем от 20 здоровых людей, на 0,5 мл - 1 фл.

на 100 определений

1. *Техпластин* - лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь, на 5,0 мл суспензии (25 определений) - 4 фл.

МИЧ Техпластина в разных сериях составляет 1.1 или 1.2.

2. *Контрольная плазма* - лиофильно высушенный пул плазмы крови не менее, чем от 20 здоровых людей, на 0,5 мл - 1 фл.

Реагенты проверены на содержание вирусов гепатита и ВИЧ.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения протромбинового времени - в диапазоне от 11 до 90 с.

Коэффициент вариации результатов определения протромбинового времени не превышает 6%. Допустимый разброс результатов определения протромбинового времени в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

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

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- коагулометр, при отсутствии коагулометра - секундомер, термобаня на +37°C;
- пипетки вместимостью 0,1, 0,2, 0,5 и 5,0 мл;
- пробирки стеклянные; вода дистиллированная; перчатки резиновые хирургические.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% раствор натрия лимоннокислого 3-х замещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз, избыток цитрата натрия и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

А. Разведение Техпластина

В один флакон с Техпластином внести **2,0** или **5,0** мл² дистиллированной воды. Флакон встряхнуть и выдержать при +37°C (на водяной бане) в течение 20 мин. Перед каждым определением разведенный реагент перемешать с тем, чтобы не было осадка.

Полученную суспензию можно использовать в течение 6 ч в условиях хранения при температуре +37°C, в течение 48 ч - при комнатной температуре (+18...+25°C) и в течение 7 дней - при температуре +2...+8°C.

Б. Разведение контрольной плазмы

Во флакон с контрольной плазмой внести **0,5** мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 3 мин. Разведенную плазму перед исследованием выдержать 25-30 мин при комнатной температуре. Использовать для получения нормативных данных и контроля активности разведенного Техпластина.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Определение контрольных (нормальных) показателей

1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл контрольной плазмы.
2. Инкубировать при температуре +37°C 1 мин.
3. Добавить 0,2 мл разведенного Техпластина, имеющего температуру +37°C и начать отсчет времени свертывания до образования фибрина.

Аналогично определить протромбиновое время в образцах плазмы больных.

В норме протромбиновое время, измеренное на коагулометре, составляет 11-14 с, при мануальной технике определения - 12-15 с.

Чтение результатов. Результат выражают по одному из следующих вариантов:

¹ МИЧ определяется фирмой-изготовителем по международной стандартной процедуре на коагулометре "Тромбостат" фирмы Behnk Elektronik

² см. варианты комплектации набора Техпластин-тест

1. Отмечают протромбиновое время (ПВ) в секундах у больного с указанием значений, полученных при исследовании контрольной плазмы.
2. Рассчитывают протромбиновое отношение (ПО) по формуле:

$$ПО = \frac{ПВ \text{ больного}}{ПВ \text{ контрольной плазмы}}$$

В норме ПО составляет 0,7-1,1.

3. Определяют протромбиновый показатель по Квику (см. Приложение и калибровочную сетку). В норме показатель по Квику при использовании Техпластина составляет 60-130% от нормы.

4. При контроле за непрямыми антикоагулянтами определяют международное нормализованное отношение (МНО) исходя из ПО и международного индекса чувствительности (МИЧ), который для данной серии тромбопластина составляет 1,1.

Последовательность расчета:

А)
$$ПО = \frac{ПВ \text{ больного}}{ПВ \text{ контрольной плазмы}}$$

Б)
$$МНО = ПО^{МИЧ}$$

Пример: ПВ плазмы больного, получающего непрямые антикоагулянты - 36 с.
 ПВ контрольной плазмы - 12 с. МИЧ - 1,1.

В этом случае $МНО = ПО^{МИЧ} = (36 : 12)^{1,1} = 3,00^{1,1} = 3,35$.

Нормальное МНО близко к 1,0. При лечении антикоагулянтами непрямого действия доводят МНО до 2,0-3,5, в зависимости от клинических показаний. Чем выше МНО, тем значительнее полученная гипокоагуляция и тем чаще и опаснее геморрагические осложнения.

Таблица пересчета ПО в МНО при чувствительности тромбопластина (МИЧ), равной 1,1.

ПО	МНО	ПО	МНО	ПО	МНО	ПО	МНО
0,70	0,68	2,60	2,86	4,50	5,23	6,40	7,71
0,80	0,78	2,70	2,98	4,60	5,36	6,50	7,84
0,90	0,89	2,80	3,10	4,70	5,49	6,60	7,97
1,00	1,00	2,90	3,23	4,80	5,62	6,70	8,10
1,10	1,11	3,00	3,35	4,90	5,74	6,80	8,24
1,20	1,22	3,10	3,47	5,00	5,87	6,90	8,37
1,30	1,33	3,20	3,59	5,10	6,00	7,00	8,50
1,40	1,45	3,30	3,72	5,20	6,13	7,10	8,64
1,50	1,56	3,40	3,84	5,30	6,26	7,20	8,77
1,60	1,68	3,50	3,97	5,40	6,39	7,30	8,91
1,70	1,79	3,60	4,09	5,50	6,52	7,40	9,04
1,80	1,91	3,70	4,22	5,60	6,65	7,50	9,17
1,90	2,03	3,80	4,34	5,70	6,78	7,60	9,31
2,00	2,14	3,90	4,47	5,80	6,91	7,70	9,44
2,10	2,26	4,00	4,59	5,90	7,05	7,80	9,58
2,20	2,38	4,10	4,72	6,00	7,18	7,90	9,71
2,30	2,50	4,20	4,85	6,10	7,31	8,00	9,85
2,40	2,62	4,30	4,98	6,20	7,44		
2,50	2,74	4,40	5,10	6,30	7,57		

Таблица пересчета ПО в МНО при чувствительности тромбопластина (МИЧ), равной 1,2.

ПО	МНО	ПО	МНО	ПО	МНО	ПО	МНО
0,70	0,65	2,60	3,15	4,50	6,08	6,40	9,28
0,80	0,77	2,70	3,29	4,60	6,24	6,50	9,45
0,90	0,88	2,80	3,44	4,70	6,40	6,60	9,63
1,00	1,00	2,90	3,59	4,80	6,57	6,70	9,80
1,10	1,12	3,00	3,74	4,90	6,73	6,80	9,98
1,20	1,24	3,10	3,89	5,00	6,90	6,90	10,15
1,30	1,37	3,20	4,04	5,10	7,06	7,00	10,33
1,40	1,50	3,30	4,19	5,20	7,23	7,10	10,51
1,50	1,63	3,40	4,34	5,30	7,40	7,20	10,69
1,60	1,76	3,50	4,50	5,40	7,57	7,30	10,86
1,70	1,89	3,60	4,65	5,50	7,73	7,40	11,04
1,80	2,02	3,70	4,81	5,60	7,90	7,50	11,22
1,90	2,16	3,80	4,96	5,70	8,07	7,60	11,40
2,00	2,30	3,90	5,12	5,80	8,24	7,70	11,58
2,10	2,44	4,00	5,28	5,90	8,41	7,80	11,76
2,20	2,58	4,10	5,44	6,00	8,59	7,90	11,94
2,30	2,72	4,20	5,60	6,10	8,76	8,00	12,13
2,40	2,86	4,30	5,76	6,20	8,93		
2,50	3,00	4,40	5,92	6,30	9,10		

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор в разной комплектации рассчитан на проведение 40 или 100 анализов. Один флакон с Техпластином рассчитан на 10 или 25 анализов при расходе реагента по 0,2 мл на 1 анализ.

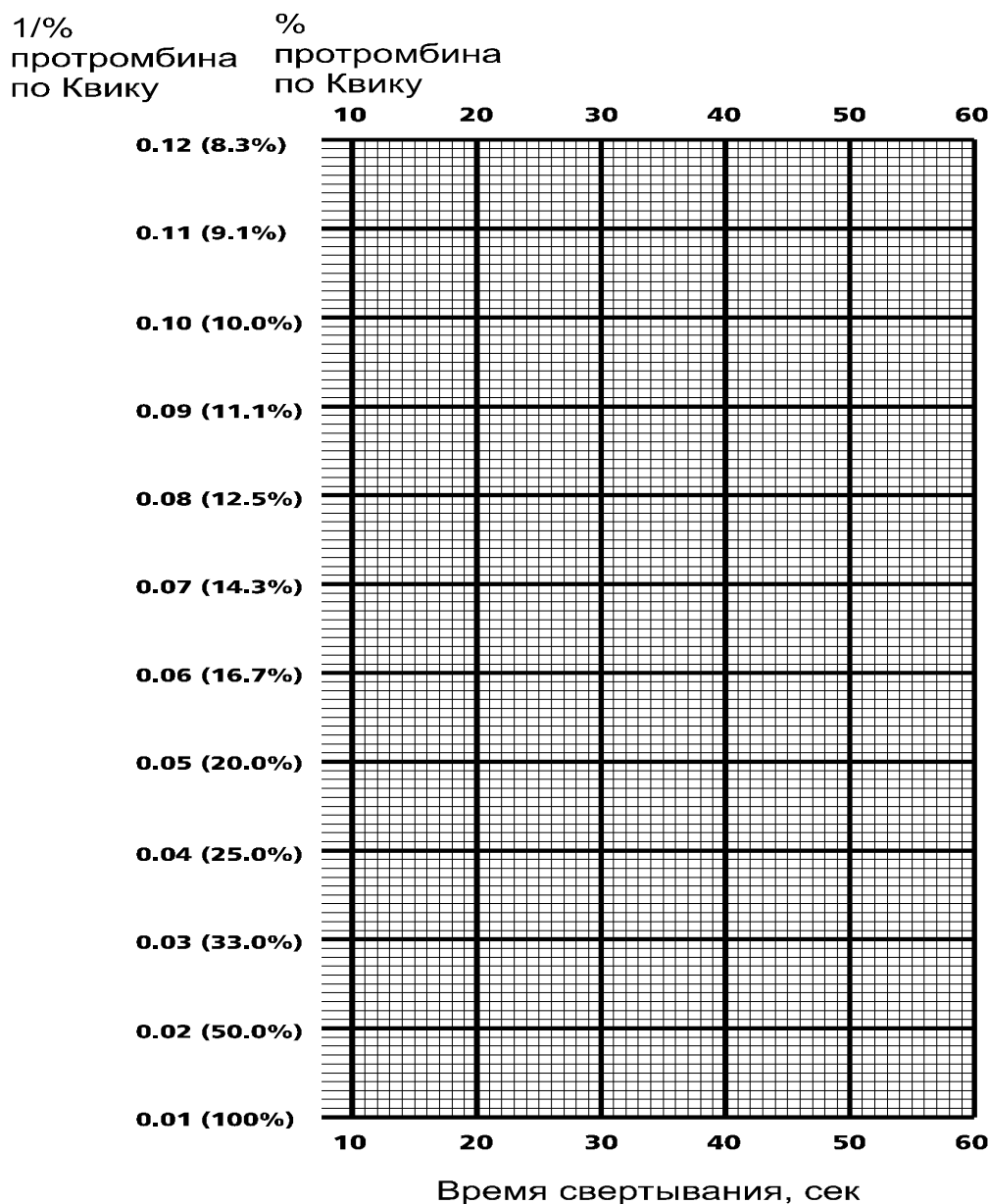
Хранение Техпластин-теста должно проводиться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности (12 мес.). Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 7 дней и **не более 3 дней** при температуре +30...+37°C.

Разведенный Техпластин можно хранить при температуре +37°C не более 6 ч, комнатной температуре (+18...+25°C) - не более 48 ч или не более 7 дней - при температуре +2...+8°C, не замораживать. Контрольную плазму после разведения можно хранить при комнатной температуре не более 2 ч.

Приложение: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТРОМБИНОВОГО ПОКАЗАТЕЛЯ ПО КВИКУ

Принцип. Протромбин по Квику характеризует активность факторов протромбинового комплекса, выраженную в %, которую определяют по калибровочному графику.

График строят путем измерения протромбинового времени свертывания в разведениях контрольной нормальной плазмы, приготовленной при смешивании 8-10 образцов бедной тромбоцитами плазмы здоровых людей. Показатель по Квику в ней принимают за 100%. Пробы такой плазмы могут храниться в замороженном виде, но размораживаться должны на водяной бане при температуре +37°C в течение 2-3 мин³.



КООРДИНАТНАЯ СЕТКА ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Готовят разведения этой плазмы в физиологическом (0,9%) растворе хлорида натрия в соответствии с приведенной ниже схемой:

Приготовление калибровочных разведений контрольной плазмы

Номер пробы	Контрольная плазма и ее разведения	+ Физиологический раствор	Разведение	Протромбин нормальной плазмы, %
1	0,25 мл	+ 0,0 мл	-	100
2	0,25 мл	+ 0,25 мл	1 + 1	50
3	0,25 мл пробы 2	+ 0,25 мл	1 + 3	25
4	0,25 мл пробы 3	+ 0,25 мл	1 + 7	12,5

С каждой пробой (№1-4) дважды определяют протромбиновое время (в сек), как описано выше (см. п.2. Проведение анализа). Полученные средние значения наносят на вертикальную ось калибровочной сетки. На горизонтальную ось этой же сетки наносят значения протромбина в разведениях контрольной плазмы, например, 100, 50, 25 и 12,5%. Через полученные на пересечениях точки проводят калибровочную прямую.

Определение протромбинового показателя по Квику в плазме больного

³ Для построения калибровочной кривой может быть использована коммерческая лиофилированная контрольная нормальная плазма, аттестованная по данному показателю.

Определяют протромбиновое время (в сек) в плазме больного как описано выше (см. п.2. Проведение анализа) и по калибровочному графику значения времени переводят в протромбин по Квику (в %).

В норме протромбин по Квику при использовании набора "Техпластин-тест" составляет 60-130% от нормы. При лечении непрямыми антикоагулянтами оптимальный уровень показателя находится в диапазоне от 10 до 20%, что соответствует международному нормализованному отношению (МНО) 2,0-3,5.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гаранина Е.Н., Авдеева Н.А. Стандартизация и контроль качества исследования протромбинового времени (обзор литературы) // Клинич. лаборат. диагностика. -1994. - № 6. - С. 23-25.
2. Eberhard F. Mammen. Мониторинг терапии пероральными антикоагулянтами // Лаборатория. - 1997. - № 7. - С. 10-12.
3. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы диагностики нарушений гемостаза. - М.: "Ньюдиамед-АО", 1999. - 224 с.