

Тромбопластин

Инструкция по применению

Фасовка. Тканевый тромбопластин (лиофильно высушенный), 1,0 г - во флаконе.
Реагент проверен на содержание вирусов гепатита и ВИЧ.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тканевый тромбопластин получен из мозга человека и предназначен для оценки протромбинового времени свертывания. Определение протромбинового времени используется для тестирования факторов протромбинового комплекса (II - протромбина, V, VII, X) и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия. Реагент не стандартизирован по международному индексу чувствительности - МИЧ.

Тромбопластин применяется также для определения концентрации фибриногена гравиметрическим методом (по Рутберг).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

А. Приготовление суспензии тромбопластина

Навеску сухого тромбопластина (50 мг) поместить в фарфоровую ступку, добавить 1,0 мл физиологического (0,9%) раствора хлорида натрия или раствора трис-буфера (0,05 М, рН 7,4)¹ и тщательно растереть в течение 2 мин. Затем дополнительно добавить в ступку 4,0 мл выбранного раствора, перемешать с помощью пестика и взвесить центрифугировать при 1000 об/мин (240g) в течение 5-6 мин. Надосадочную жидкость (суспензию тромбопластина) слить в другую пробирку и использовать для анализа.

Б. Определение протромбинового времени по Квик (Quick)

Для выполнения метода дополнительно требуется хлористый кальций (0,277% раствор).

Предварительно приготовить смесь из равных объемов 0,277% раствора хлорида кальция и суспензии тромбопластина. Смесь прогреть на водяной бане при температуре +37°C в течение 15-20 мин. В результате получают тромбопластин-кальциевую смесь (ТКС).

Определение контрольных (нормальных) показателей

1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл контрольной нормальной бедной тромбоцитами плазмы².
2. Инкубировать при температуре +37°C 1 мин.
3. Добавить 0,2 мл ТКС, имеющей температуру +37°C и начать отсчет времени свертывания до образования фибрина.

Аналогично определить протромбиновое время в образцах плазмы больных.

В. Унифицированный метод определения протромбинового времени (1974)

1. В пробирку внести 0,1 мл исследуемой бедной тромбоцитами плазмы крови и 0,1 мл суспензии тромбопластина. Смесь прогреть на водяной бане при +37°C в течение 1 мин.
2. В ту же пробирку внести 0,1 мл 0,277% раствора хлорида кальция (предварительно прогретого на водяной бане при температуре +37°C). Немедленно включить секундомер и отметить время свертывания.

Аналогично определить протромбиновое время в контрольной нормальной плазме (или РНП-плазме).

Результат анализа выражают по одному из следующих вариантов:

1. Отмечают протромбиновое время (ПВ) в секундах у больного с указанием значений, полученных при исследовании контрольной нормальной плазмы. В нормальной плазме протромбиновое время составляет 14-17 с.
2. Рассчитывают протромбиновый индекс (ПИ) в % по формуле³:

$$\text{ПТИ} = \frac{\text{ПВ контрольной нормальной плазмы}}{\text{ПВ больного}} \times 100\%$$

Норма - 90-105%. При контроле за лечением непрямыми антикоагулянтами ПТИ должен составлять 40-60%, а протромбиновое время увеличиваться примерно в 2 раза в сравнении с контрольной нормальной плазмой.

В. Определение концентрации фибриногена (по Рутберг)

1. В пробирке последовательно смешать 1,0 мл исследуемой бедной тромбоцитами плазмы крови, 0,1 мл суспензии тромбопластина и 0,1 мл 5% раствора хлорида кальция.
2. Пробирку встряхнуть и поместить на водяную баню при температуре +37°C.
3. Через 10 мин образовавшийся сгусток перенести на фильтровальную бумагу и высушить путем сжатия и перемещения сгустка по фильтру. Высушивание произвести до потери на фильтре следов влаги.
4. Сгусток фибрина выдержать на открытом воздухе при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 15-20 мин и взвесить на торсионных весах. В норме масса сгустка, полученного из 1 мл плазмы крови, составляет 10-20 мг. Содержание фибриногена в г/л находят при умножении массы сухого фибрина на коэффициент 0,2.
В норме содержание фибриногена в плазме составляет 2,0-4,0 г/л.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Флакон с тканевым тромбопластином рассчитан на проведение до 1000 определений протромбинового времени или такого же числа определений концентрации фибриногена.

Хранение тромбопластина должно проводиться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности (1 год). Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 10 сут.

Суспензию тромбопластина можно хранить при комнатной температуре не более 1 дня или не более 2 дней при температуре +2...+8°C, не замораживать.

Тромбопластин-кальциевую смесь можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч и при температуре +37°C - не более 3 ч.

ИНСТРУКЦИЯ

¹ не допустимо растереть тромбопластин в дистиллированной воде!

² может быть использована РНП-плазма фирмы "Технология-Стандарт".

³ Устаревший вариант оценки протромбинового теста. Для современной оценки метода необходимо использовать растворимые, стандартизированные по МИЧ реагенты (например, Техпластин).

по применению набора реагентов для определения
протромбинового времени и концентрации фибриногена

КВИК-ФГ-тест

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Квик-Фг-тест предназначен для одновременного выполнения исследования системы гемостаза - протромбинового времени и концентрации фибриногена. Определение протромбинового времени используется для тестирования факторов свертывания II (протромбина), V, VII, X и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия. Определение концентрации фибриногена используется для диагностики приобретенной недостаточности этого белка (ДВС-синдром, тяжелые заболевания печени, лечение фибринолитиками), а также врожденной а/типо/дисфибриногемии. Увеличение концентрации фибриногена наблюдается также при инфекционных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, хронических воспалительных процессах, во время беременности.

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 добавляемых ионов кальция и тканевого тромбопластина (экстракта из мозга человека). После быстрого обезвоживания сгустка (путем отжима на фильтровальной бумаге) измеряется масса образовавшегося фибрина, по которой рассчитывается концентрация фибриногена в плазме.

Состав набора.

1. Тромбопластин (лиофильно высушенный), 1 г - 2 фл. Реагент проверен на содержание вирусов гепатита и ВИЧ.
2. Хлорид кальция (концентрированный 20:1 раствор, 5,54%), 20 мл - 3 фл.
3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл - 2 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения протромбинового времени - в диапазоне от 14 до 120 с, а для концентрации фибриногена от 1 до 8 г/л. Коэффициент вариации результатов определения протромбинового времени не превышает 6%, а при определении концентрации фибриногена - 10%. Допустимый разброс результатов определения протромбинового времени и концентрации фибриногена 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

- термобаня на 37°C; весы торсионные;
- центрифуга лабораторная; секундомер;
- пипетки вместимостью 0,1 мл; 0,2 мл; 5,0 мл;
- пробирки стеклянные; цилиндр мерный вместимостью 200 мл;
- ступка фарфоровая с пестиком; вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная; 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 и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

А. Разведение концентрированного буфера

Содержимое одного флакона с концентрированным буфером трис-НСI перенести в мерный цилиндр и довести объем дистиллированной водой до 200 мл. В результате получают рабочий раствор буфера.

Б. Приготовление суспензии тромбопластина

Навеску сухого тромбопластина (50 мг) поместить в фарфоровую ступку, добавить 1,0 мл рабочего раствора буфера и тщательно растереть в течение 2 мин. Затем добавить в ступку 4,0 мл рабочего раствора буфера, перемешать с помощью пестика и взвесить центрифугировать при 1000 об/мин (240 g) в течение 5 минут. Надосадочную жидкость (суспензию тромбопластина) слить и использовать для анализа. Полученную суспензию тромбопластина можно использовать в течение 1 дня в условиях хранения при комнатной температуре (+18...+25°C) и в течение 2 дней при температуре +2...+8°C.

В. Для определения концентрации фибриногена использовать концентрированный (5,54%) раствор хлорида кальция.

Г. Приготовление рабочего раствора хлорида кальция (для определения протромбинового времени).

Для определения протромбинового времени в день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор хлорида кальция развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды), получают рабочий раствор хлорида кальция (0,277%).

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

2.1. Определение протромбинового времени по Квик (Quick)

Предварительно приготовить смесь из равных объемов 0,277% раствора хлорида кальция и суспензии тромбопластина. Смесь прогреть на водяной бане при температуре +37°C в течение 15-20 мин. В результате получают тромбопластин-кальциевую смесь (ТКС).

Определение контрольных (нормальных) показателей

1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл контрольной нормальной бедной тромбоцитами плазмы⁴.
2. Инкубировать при температуре +37°C 1 мин.
3. Добавить 0,2 мл ТКС, имеющей температуру +37°C и начать отсчет времени свертывания до образования фибрина.

Аналогично определить протромбиновое время в образцах плазмы больных.

В нормальной плазме протромбиновое время составляет 14-17 с.

2.2. Определение концентрации фибриногена

1. В пробирке последовательно смешать 1,0 мл исследуемой плазмы крови, 0,1 мл суспензии тромбопластина и 0,1 мл концентрированного раствора (5,54%) хлорида кальция.

2. Пробирку встряхнуть и поместить на водяную баню при температуре +37°C.

3. Через 10 мин образовавшийся сгусток перенести на фильтровальную бумагу и высушить путем сжатия и перемещения сгустка по фильтру.

Высушивание произвести до потери на фильтре следов влаги.

4. Сгусток фибрина выдержать на открытом воздухе при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 15-20 мин и взвесить на торсионных весах.

В норме масса сгустка, полученного из 1,0 мл плазмы крови, составляет 10-20 мг. Содержание фибриногена в г/л находят при умножении массы сухого фибрина на коэффициент **0,2**.

В норме содержание фибриногена в плазме составляет 2,0-4,0 г/л.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на одновременное проведение 400 анализов по определению протромбинового времени и концентрации фибриногена, при расходе реагентов по 0,1 мл на 1 анализ.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности набора (18 мес.). Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Время использования набора не должно превышать 2 мес. с момента вскрытия его компонентов.

Лиофилизированный тромбопластин после вскрытия флакона можно хранить при температуре +2...+8°C не более 1 мес.

Суспензию тромбопластина можно хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 1 дня или не более 2 дней при температуре +2...+8°C, не замораживать.

Тромбопластин-кальциевую смесь можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч и при температуре +37°C - не более 3 ч.

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре +2...+8°C не более 1 мес.

Концентрированный раствор хлорида кальция можно хранить при температуре +2...+8°C не более 2 мес при условии герметизации флакона.

Рабочий раствор хлорида кальция можно хранить при комнатной температуре не более 1 дня или не более 2 дней при температуре +2...+8°C.

⁴ Может быть использована РНП-плазма фирмы "Технология-Стандарт".