

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения протромбинового времени
«МЛТ-ТРОМБОПЛАСТИН»

1. Назначение

Набор предназначен для определения протромбинового времени свертывания (далее ПВ) в плазме крови человека. Определение ПВ применяется для тестирования уровня факторов протромбинового комплекса (II - протромбина, V, VII, X) и контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия.

2. Принцип действия набора

Принцип метода заключается в определении времени свертывания цитратной плазмы крови под влиянием тромбопластина (растворимого экстракта из тканей мозга кролика) в присутствии ионов кальция. Снижение концентрации факторов протромбинового комплекса сопровождается удлинением времени свертывания плазмы крови.

3. Состав набора

1. Тромбопластин (лиофильно высушенная тромбопластин-кальциевая смесь) – 10 флаконов.

Набор рассчитан на проведение 300 анализов при определении вручную и на коагулометрах с рабочим объемом кюветы 300 мкл, или 600 анализов при определении на коагулометрах с рабочим объемом кюветы 150 мкл.

4. Аналитические и диагностические характеристики

1. ПВ нормальной плазмы, содержащей 100% факторов протромбинового комплекса составляет – 14-19 сек.

2. Международный индекс чувствительности тромбопластина (МИЧ) – не более 1,50.

3. Коэффициент вариации результатов определения ПВ не превышает – 10%.

4. Допустимый разброс результатов определения ПВ в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии не превышает – 10%.

5. Меры предосторожности

Компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки, так как образцы человеческой крови следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать возбудителей вирусной инфекции.

6. Оборудование и материалы

1. коагулометр;
2. пипетки для дозирования объемов от 50 до 100 мкл (или от 100 до 200 мкл, если рабочий объем кюветы составляет 300 мкл) и 6 мл (для растворения реактива);
3. пробирки пластиковые (если требуется предварительное разведение плазмы);
4. перчатки резиновые хирургические;
5. физиологический раствор (0,9% раствор NaCl).
6. вода дистиллированная;
7. центрифуга лабораторная.

7. Приготовление анализируемых образцов крови

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую пробирку, содержащую 0,11 М раствор натрия лимоннокислого 3-х замещенного (3,2% раствор 2-водной

соли, или 3,8% раствор 5,5-водной соли). Соотношение объемов крови и цитрата натрия – 9:1. Кровь центрифугируют при 3000 об/мин (1200-1500g) в течение 10 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пластиковую пробирку, где хранят до проведения исследования. Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови!

8. Подготовка компонентов набора

1. *Приготовление рабочего раствора тромбопластина.*

Содержимое флакона с лиофильно высушенным тромбопластином растворить в **6,0 мл** дистиллированной воды. Выдержать тромбопластин при комнатной температуре +18-+25°C в течение 30 мин (периодически мягко перемешивая) Перед применением рабочую порцию тромбопластина прогреть в течение 30 мин при температуре +37°C.

9. Проведение анализа

Для коагулометров АПГ2-02, АПГ2-02П, АПГ4-02П:

1. В кювету коагулометра внести **50 мкл** исследуемой (или контрольной) плазмы;
2. Инкубировать (прогреть) в течение **60 сек**;
3. Внести в кювету коагулометра **100 мкл** рабочего раствора тромбопластина и определить время образования сгустка.

<i>Внести в кювету коагулометра:</i>	<i>Объем</i>
Плазма исследуемая (или контрольная)	50 мкл
Инкубировать при +37°C – 60 сек	
Тромбопластин-реагент, прогретый при температуре +37°C	100 мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах	

Для коагулометров с рабочим объемом кюветы 0,3 мл или ручных методов:

<i>Внести в кювету(пробирку)</i>	<i>Объем</i>
Плазма исследуемая (или контрольная)	100 мкл
Инкубировать при +37°C – 60 сек	
Тромбопластин-реагент, прогретый при температуре +37°C	200 мкл
Зафиксировать время свертывания в секундах	

10. Результаты анализа

Результаты анализа выражают следующими способами:

1. Протромбиновое время (далее ПВ в секундах);
 2. Процентное содержание протромбина по Квику (в %).
- Процентное содержание протромбина по Квику определяют по калибровочному графику, который строят в координатах: время свертывания в сек от 1/% протромбина по Квику контрольной плазмы. Для каждой серии набора необходимо строить свою калибровку.

Для этого определяют время свертывания следующих разведений контрольной плазмы (плазмы-калибратора):

Протромбин контрольной плазмы в %	A%	0,5A%	0,25A%
Контрольная плазма, мкл	250	250	250
Физиологический раствор (0,9% раствор NaCl), мкл	0	250	750

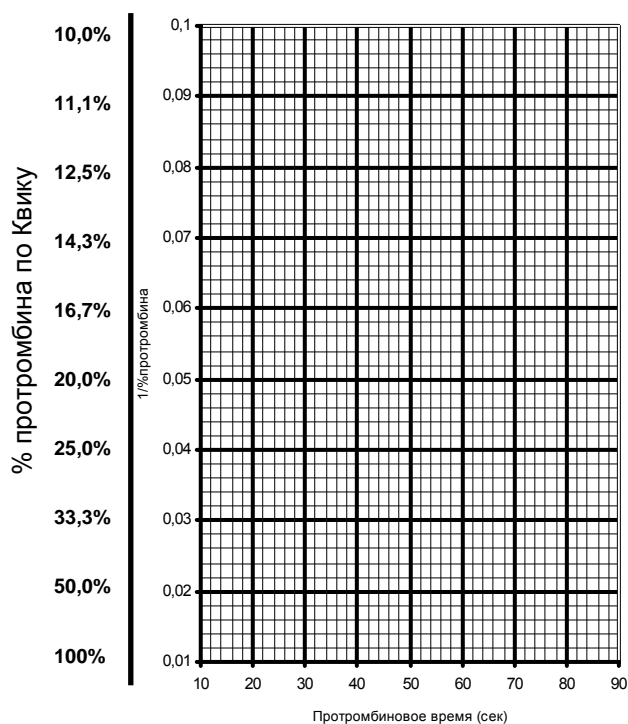
где A – аттестованное значение % протромбина по Квику в контрольной плазме.

Внимание!

Стабильность образцов после разведения снижается! При разведении в конических пробирках типа «Эппендорф» для перемешивания плазмы с физиологическим раствором рекомендуется опустить наконечник пипетки до дна пробирки и перемешать многократным засасыванием и выдуванием (без «дожима» во избежание вспенивания образцов). Перемешивание на вортексе и переворачиванием пробирки повышает вероятность образования потенциально опасного аэрозоля!

Для каждого разведения контрольной плазмы необходимо определить ПВ в секундах и нанести полученные значения на координатную сетку (см. ниже) – на горизонтальную ось абсцисс (X). На вертикальную ось ординат (Y) следует нанести разведения плазмы – калибратора в %. Через полученные на пересечении точки провести калибровочный график, который должен представлять собой прямую линию. Для удобства работы на график нанесена также вторая ось (Y) с величинами, обратными значению протромбина (1/% протромбина).

Координатная сетка для построения калибровочного графика по Квику.



3. Протромбиновое отношение (ПО) – отношение времени свертывания плазмы пациента к времени свертывания контрольной плазмы.

$$ПО = \frac{ПВ_{пациента}}{ПВ_{контр.}}$$

где $ПВ_{пациента}$ – время свертывания плазмы пациента

$ПВ_{контр.}$ – время свертывания контрольной (нормальной) плазмы.

4. Международное нормализованное отношение (МНО) – протромбиновое отношение, возведенное в степень международного индекса чувствительности (МИЧ) тромбопластина.

$$МНО = \left(\frac{ПВ_{пациента}}{ПВ_{контр.}} \right)^{МИЧ} = ПО^{МИЧ}$$

Результаты теста выражают в единицах МНО при контроле за лечением антикоагулянтами непрямого действия!

Нормальные величины протромбина составляют:

1. Протромбиновое время 14-19 сек
2. Процент содержания протромбина по Квику 70-130 %

10. Условия хранения и эксплуатации

Срок годности – 12 месяцев.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2-+8°C в течение всего срока годности (12 месяцев). Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 5 суток.

После растворения рабочий раствор тромбопластина можно хранить без утраты активности в течение 4 часов при температуре +37°C или 5 суток при +2-+8°C.

Для получения оптимальной стабильности необходимо сохранять тромбопластин в фирменном флаконе при температуре +2-+8°C и использовать рабочими порциями.

Не замораживать!