

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения тромбинового времени

Тромбо-тест

на 50 и 400 определений

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для определения тромбинового времени при диагностике нарушений конечного этапа свертывания крови.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Заключается в определении времени свертывания плазмы крови под влиянием тромбина стандартной активности.

Состав набора:

на 50 определений

1. Тромбин (лиофильно высушенный, 6-8 ед НИН во фл.) - 4 фл.
2. Стандарт-плазма (лиофильно высушенная) - 1 фл.

на 400 определений

1. Тромбин (лиофильно высушенный, 500 ед НИН во фл.) - 1 фл.
2. Стандарт-плазма (лиофильно высушенная) - 2 фл.
3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения тромбинового времени - в диапазоне от 11 до 120 с.

Коэффициент вариации результатов определения тромбинового времени не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения тромбинового времени в одной пробе плазмы 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° С;
- пипетки вместимостью 0,1-1,0 мл; 10,0 мл;
- пробирки стеклянные, цилиндр мерный вместимостью 200 мл;
- физиологический (0,9%) раствор хлорида натрия;
- 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.

Внимание! При обследовании больных, получающих гепарин, рекомендуется предварительно очистить плазму от антикоагулянта (см. реагент "Гепасорб-1", производства фирмы "Технология-Стандарт").

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

Вариант для набора на 50 опред.

А. Разведение тромбина

В один из флаконов с тромбином внести 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°С) и легком покачивании в течение 2-3 мин. В результате получают раствор тромбина (3-4 ед. НИН/мл).

Свертывающая активность полученного раствора проверяется (см. ниже, а также таблицу) на стандарт-плазме плазме.

Для приготовления менее активного раствора тромбина во флакон с лиофильно высушенным реагентом можно внести не 2,0 мл, а 2,5 или 4,0 мл дистиллированной воды (см. таблицу).

Ориентировочные значения нормы тромбинового времени свертывания (в ручном и коагулометрическом вариантах)

Объем дистиллированной воды на флакон с тромбином, мл	Время свертывания, с	
	при коагулометрическом определении	при мануальном определении
2,5	13-16	14-17
3,0	16-20	17-21
5,0	23-29	27-34

Раствор тромбина рекомендуется не прогревать при температуре +37°С и хранить при комнатной температуре (+18...+25°С) не более 2 ч.

Б. Разведение стандарт-плазмы.

В один из флаконов со стандарт-плазмой внести **1,0** мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°C) и легком покачивании в течение 3 мин. Использовать для контроля активности тромбина. Стандарт-плазму во втором флаконе разводят и применяют по мере необходимости.

Вариант для набора на 400 опред.

А. Разведение концентрированного буфера.

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

Б. Разведение тромбина.

1. Во флакон с тромбином внести 10,0 мл физиологического (0,9%) раствора хлорида натрия и развести содержимое при комнатной температуре (+18...+25°C) и легком покачивании в течение 2-3 мин. В результате получают маточный раствор тромбина (хранится без потери коагуляционной активности при температуре +2...+8°C до 30 дней).

2. Для приготовления рабочего раствора тромбина смешать в пробирке один объем маточного раствора тромбина с **17** объемами рабочего раствора буфера. Полученный рабочий раствор тромбина при добавлении к разведенной стандарт-плазме (см. *Проведение анализа*) должен иметь активность 15-16 с. В случае необходимости к раствору добавить небольшое количество буфера или маточного раствора тромбина для получения требуемой активности последнего.

Рабочий раствор тромбина для сохранения активности рекомендуется готовить в силиконированной или пластиковой (полистироловой) пробирке, не прогревать при температуре +37°C и хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) до использования.

В. Разведение стандарт-плазмы.

Разводится аналогично (см. выше). Стандарт-плазму во втором флаконе разводят и применяют по мере необходимости.

3. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Поместить 0,2 мл исследуемой плазмы в пробирку, прогреть 1 мин при +37°C. При работе на коагулометре в кювету внести и прогреть в течение 1 мин 0,1 мл плазмы.

2. Добавить 0,2 мл рабочего раствора тромбина (имеющего температуру +18...+25°C!) и включить секундомер (в коагулометрическом варианте выполнения методики в кювету внести 0,1 мл раствора тромбина и начать отсчет времени свертывания).

В мануальном варианте анализа отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

4. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат выражают в секундах, сравнивают время свертывания контрольной и исследуемой плазмы. В норме тромбиновое время составляет 14-17 с. Укорочение тромбинового времени свертывания, как правило, свидетельствует о гиперфибриногенемии. Чаще при обследовании больных с патологией системы гемостаза встречается удлинение тромбинового времени, что может быть обусловлено следующими причинами:

- присутствие в крови быстродействующих антикоагулянтов (гепарин и др.);
- образование и накопление в кровотоке продуктов деградации фибриногена/фибрина (ПДФг/Фн), обладающих антитромбиновой активностью;
- гипофибриногенемия;
- дисфибриногенемия (качественный дефект фибриногена);

Полная несвертываемость плазмы под влиянием тромбина наблюдается сразу после внутривенного введения терапевтических доз (5000-10000 ед) гепарина.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор в разной комплектации рассчитан на проведение 50 или 400 анализов при расходе раствора тромбина по 0,2 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 1 мес с момента вскрытия его компонентов, а при детальном использовании предварительно разведенных и замороженных компонентов набора - 2 мес (см. ниже).

Маточный раствор тромбина можно хранить при температуре +2...+8°C не более 30 дней. Для увеличения срока годности маточного раствора тромбина с 1 до 2 мес рекомендуется сразу после разведения разделить маточный раствор тромбина на 2 равные части, одну из которых в герметично закрытом виде хранить при температуре -8...-20°C.

Рабочий раствор тромбина можно хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 2 ч или не более 6 ч при температуре +2...+8°C.

Стандарт-плазму после разведения можно хранить при температуре +18...+25°C не более 3 ч.

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре +2...+8°C не более 1 месяца. Для увеличения срока годности рабочего раствора буфера с 1 до 2 мес рекомендуется сразу после разведения разделить этот раствор на 2 равные части, одну из которых в герметично закрытом виде хранить при температуре -8...-20°C.