

Работа на автоматических коагулометрах с использованием реагентов отечественного производства

Автоматический коагулометр Roche STA Compact



Методическое руководство

Москва, 2016

Авторы: Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Кишинец Р.С., Хурдин В.В., Бабенко С.В., Меркулов Н.С., Яценко Е.А., Прокопьева Н.В.
Работа на автоматическом коагулометре Roche STA Compact реагентами торговой марки «Ренам»

Методическое руководство

Нередки случаи ложных результатов клинических лабораторных исследований, что обусловлено, в большинстве случаев, ошибками на преаналитическом этапе. Однако, достаточно часто наблюдаются ошибки и на аналитическом этапе исследования системы гемостаза. Большинство ошибок на этом этапе удается избежать путем выполнения анализа на автоматических коагулометрах. Известно, что производитель определенного коагулометра рекомендует применение реагентов того или иного производителя. С одной стороны, это удобно и надежно, но зачастую возникают ситуации, при которых лаборатория остается без вышеуказанных реактивов (недостаточность финансирования лаборатории, задержка в поставках рекомендуемых реактивов). Все это приводит к поиску альтернативных реагентов с целью обеспечения бесперебойной работы лаборатории и сохранения качества коагулологических исследований.

Данное методическое руководство предназначено для сотрудников клиничко-диагностических лабораторий, исследующих систему гемостаза. В руководстве детально описаны принципы адаптации и работы на автоматическом коагулометре Roche STA Compact.

Оглавление

Рутинные исследования.....	4
Определение протромбинового времени (РТ-МВ).....	4
Программирование прибора.....	9
Установка реагентов на борт прибора.....	15
Построение калибровочной прямой.....	17
Анализ исследуемых образцов.....	21
Интерпретация результатов.....	22
Определение активированного частичного тромбопластинового времени (АРТТ-МВ).....	23
Инструкция к набору АЧТВ-тест.....	24
Программирование прибора.....	27
Установка реагентов на борт прибора.....	30
Проведение контроля качества.....	31
Анализ исследуемых образцов.....	33
Интерпретация полученных результатов.....	34
Определение уровня фибриногена по Клауссу (FIB-МВ).....	35
Инструкция к набору Фибриноген – тест.....	36
Программирование прибора.....	38
Установка реагентов на борт прибора.....	42
Построение калибровочной прямой.....	43
Анализ исследуемых образцов.....	44
Интерпретация результатов.....	44
Определение тромбинового времени (ТТ-МВ).....	45
Инструкция к набору Тромбин-реагент.....	46
Программирование прибора.....	48
Установка реагентов на борт прибора.....	51
Проведение контроля качества.....	52
Анализ исследуемых образцов.....	53
Интерпретация результатов.....	53
Таблица (пример) возможных наименований реагентов для установки на борт прибора.....	54

Рутинные исследования

Определение протромбинового времени (PT-MV)

Для оценки протромбинового времени с помощью автоматического коагулометра Roche STA Compact НПО РЕНАМ рекомендует использовать Ренампластин (кат. № ПГ-5/1). Рекомендуется использовать методику определения протромбинового времени по созданному тесту на основе протокола **PT-MV** (PT).

В качестве плазмы-калибратора рекомендуется использовать «Протромбин-калибратор» (кат. № КМ-18). Также возможно использование плазмы-калибратора «Мультикалибратор» (кат. № КМ-16)

В качестве контроля в нормальной области рекомендуется использовать контрольную плазму «Плазма Н» (кат. № КМ-1), аттестованную по шести основным параметрам (ПВ, АЧТВ, ТВ, УФ, АТ III) в нормальной и патологической областях.



Инструкция на реагент Ренампластин

РЕНАМПЛАСТИН

Код ПГ-5/1, ПГ-5/2



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тромбопластина (из головного мозга кролика) для определения протромбинового времени (Ренампластин)

НАЗНАЧЕНИЕ

Ренампластин - тромбопластин-кальциевый реагент, водорастворимый, полученный из мозга кроликов с добавлением оптимального количества ионов кальция.

Ренампластин предназначен 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.

Определение протромбинового времени - это высокочувствительный скрининговый тест, который выявляет нарушения во внешнем пути свертывания крови (ф. II, V, VII и X) и рекомендуется для:

- мониторинга терапии непрямыми антикоагулянтами;
- диагностики наследственных и приобретенных коагулопатий;
- диагностики заболеваний печени.

Ренампластин предназначен для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров и ручным методом.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав:

Ренампластин (8 мл) 10 флаконов код ПГ-5/1
3 флакона код ПГ-5/2

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор код ПГ-5/1 предназначен для проведения 800 анализов при расходе 100 мкл Ренампластин на один анализ или 400 анализов при расходе 200 мкл Ренампластин на один анализ.

Один набор код ПГ-5/2 предназначен для проведения 240 анализов при расходе 100 мкл Ренампластин на один анализ или 120 анализов при расходе 200 мкл Ренампластин 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.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения протромбинового времени: билирубин в концентрации до 0,3 г/л, свободный гемоглобин – до 5 г/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 волчаночного антикоагулянта и низкий (менее 1 г/л) уровень фибриногена в исследуемой плазме также может приводить к получению ложно завышенных результатов.

Удлинение протромбинового времени может быть связано с:

- дефицитом факторов внешнего пути свертывания (II, V, VII, X);
- дефицитом витамина К;
- приемом антикоагулянтов прямого действия (например, варфарин, синкумар и др.);
- ДВС-синдромом (фаза гипокоагуляции);
- афибриногемией, гипофибриногемией, дисфибриногемией;
- заболеванием печени;
- антикоагулянтами прямого действия (гепарин);
- злокачественными опухолями.

Укорочение протромбинового времени свидетельствует об:

- активации внешнего пути свертывания и гиперкоагуляции;
- повышении активности факторов внешнего пути свертывания;
- ДВС-синдромом;
- активацией системы фибринолиза.

Чувствительность

В зависимости от чувствительности коагулометра Ренампластин позволяет определить протромбин по Квику до 10%.

Воспроизводимость

Допустимое отклонение Международного Индекса Чувствительности (МИЧ) Ренампластин от аттестованного значения – не более 5%. Коэффициент вариации и межфлаконная вариация результатов определения протромбинового времени - не более 5%.

Линейность

Линейность определения протромбина по Квику от 12,5 до 100%

Стандартизация Ренампластин

Каждая серия Ренампластин стандартизована против вторичного международного стандарта с использованием плазм пациентов, получающих антикоагулянтную терапию. Стандартизация осуществляется по процедуре, утвержденной ВОЗ. МИЧ каждой серии Ренампластин указан в паспорте на набор.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен для диагностики in vitro. Класс опасности 2а.

При работе с набором реагентов следует соблюдать правила, описанные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Инструкция утверждена Минздравом СССР в 1991 г.). При работе с исследуемыми образцами крови пациентов 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.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- термобаня на 37°C и секундомер (для ручного определения);
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- Протромбин-калибратор (плазма с аттестованным значением протромбина по Квику и МНО);
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор (0,9% раствор натрия хлорида);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор Ренампластин предназначен 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 стеклянными поверхностями.

Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше -20°C. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2-х месяцев.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 8 ч при комнатной температуре. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

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.

Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внести во флакон с лиофилизированным реагентом Ренампластином 8 мл дистиллированной воды и растворить при покачивании. Перед проведением анализа реагент необходимо прогреть при 37°C в течение 30 мин.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

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.
- Считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом на термобане

Построение калибровочного графика

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.

Проведение анализа

Внести в кювету анализатора или в пробирку на термобане:	Объем, мкл
Протромбин-калибратор (плазма контрольная или исследуемая плазма)	50
Инкубировать при 37°C точно 1 или 2 минуты.	
Ренампластин	100

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить ПВ в исследуемой плазме от момента добавления Ренампластина до момента образования фибринового сгустка.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты протромбинового теста могут быть выражены как:

- МНО (Международное Нормализованное Отношение);
- Протромбин по Квику в % от нормы;
- Протромбиновое отношение;
- Протромбиновый индекс, %.

В норме эти показатели составляют:

Протромбиновое время, сек	14–18
МНО	0,85–1,15
Протромбин по Квику в % от нормы.	70–130
ПИ, %	90–105

Протромбиновое отношение (ПО) вычислить по формуле:

$$ПО = \frac{ПВ_{пл}}{ПВ_{100\%}}$$

где: $ПВ_{100\%}$ – среднее нормальное протромбиновое время, сек;

$ПВ_{пл}$ – ПВ исследуемой плазмы пациента, сек.

Так как

$$ПО_{\%} = \frac{ПВ_{пл}}{ПВ_{100\%}} \quad \text{то} \quad ПО = \frac{ПВ_{пл}}{ПВ_{\%}} \times ПО_{\%}$$

где: $ПВ_{\%}$ – ПВ Протромбин-калибратора, сек.

$ПО_{\%}$ – протромбиновое отношение Протромбин-калибратора (указано в паспорте на Протромбин-калибратор).

Международное Нормализованное Отношение (МНО) вычислить по формуле:

$$МНО = \left(\frac{ПВ_{пл}}{ПВ_{100\%}} \right)^{МРЧ} \quad \text{или} \quad МНО = \left(\frac{ПВ_{пл}}{ПВ_{\%}} \times ПО_{\%} \right)^{МРЧ}$$

где: МРЧ – Международной Индекс Чувствительности Ренампластина, указан в прилагаемом паспорте.

Таблица пересчета ПО в МНО приведена в прилагаемом паспорте на данную серию Ренампластина.

Протромбиновый индекс (ПИ) вычислить по формуле:

$$ПИ = \frac{ПВ_{\%}}{ПВ_{пл}} \times ПИ_{\%}$$

где: $ПИ_{\%}$ – протромбиновый индекс Протромбин-калибратора (указан в паспорте на Протромбин-калибратор).

Протромбин по Квику в % от нормы определить с помощью калибровочного графика

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) в секундах и нанести полученные значения на координатную сетку (скачать с сайта www.renam.ru). Построить калибровочный график зависимости ПВ (сек) от Протромбина по Квику (%). Затем 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.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения протромбина по Квику и МНО следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н, код КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укуленном виде при температуре 2-8°C. Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укуленном состоянии.

Стабильность Ренампластина

+37°C	+18-25°C	+2-8°C	-18-20°C
8 часов	2 суток	7 суток	3 месяца

Транспортирование наборов должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание наборов допускается.

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 Ренампластином с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б. Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на %, завязывают, маркируют надписью: «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.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу:

125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, корп. 2.

тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru

Пример паспорта на реагент Ренампластин

Ренампластин

Серия № 7012

Годен до: 06.14

№ п/п	Наименование показателя	По ТУ 9398-254-05595541-02	Фактическое значение
1	Внешний вид Ренампластина	Пористая масса серого цвета	Соответствует
2	Растворимость Ренампластина, мин. не более	3	Соответствует
3	Активность Ренампластина в пуле донорской плазмы, сек.	12 – 18	15,5
4	Международный Индекс Чувствительности (МИЧ)	1,0 – 1,2	1,16
5	Допустимое отклонение активности Ренампластина от аттестованного значения, % не более	10	Соответствует
6	Допустимое отклонение МИЧ Ренампластина от аттестованного значения, % не более	10	Соответствует
7	Чувствительность, в % протромбина не более	12,5	Соответствует
8	Линейность в диапазоне концентраций 100-25 %, отклонение в % не более	10	Соответствует
9	Коэффициент вариации результатов определения, % не более	10	Соответствует

Пример паспорта
Протромбин-калибратор

Серия 0113

Годен до: 06.14

№ п/п	Исследуемые параметры гемостаза	Значение (M±2σ)
1	ПО, Ренампластин	1,0±0,05
2	ПО, Тромбопластин	1,0±0,05
3	Активность протромбина по Квику, в % (Ренампластин)	100±5
4	Активность протромбина по Квику, в % (Тромбопластин)	100±5

Программирование прибора

В режиме ожидания (отсутствие заданий) нажимаем клавишу **Esc** и в открывшемся меню выбираем пункт меню **Setup/Tests**.

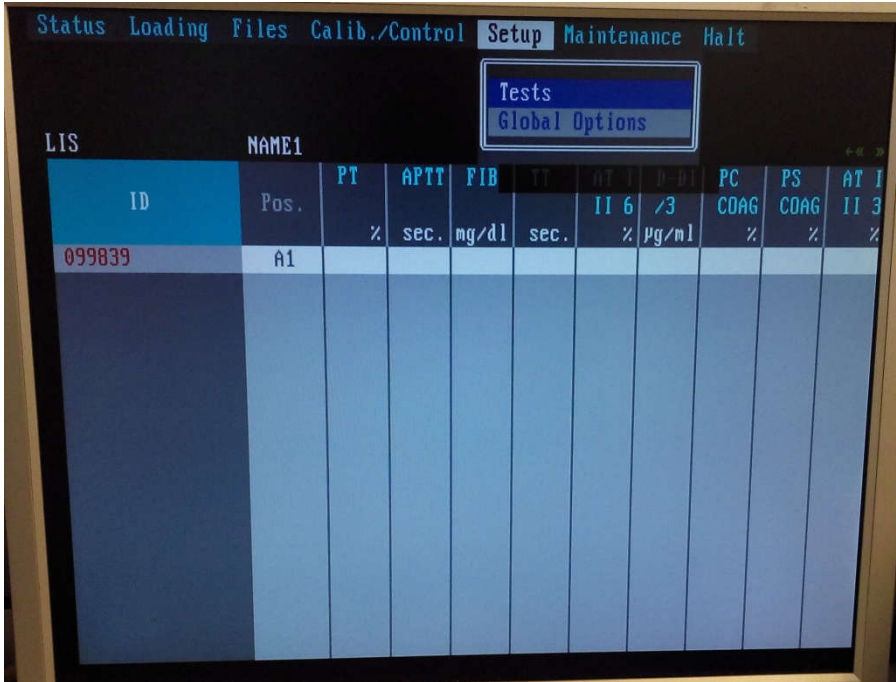


Рис.1

В открывшемся окне необходимо перевести курсор в конец списка, на пустую строчку, для создания нового протокола. Это можно сделать путем нажатия клавиши **End**.

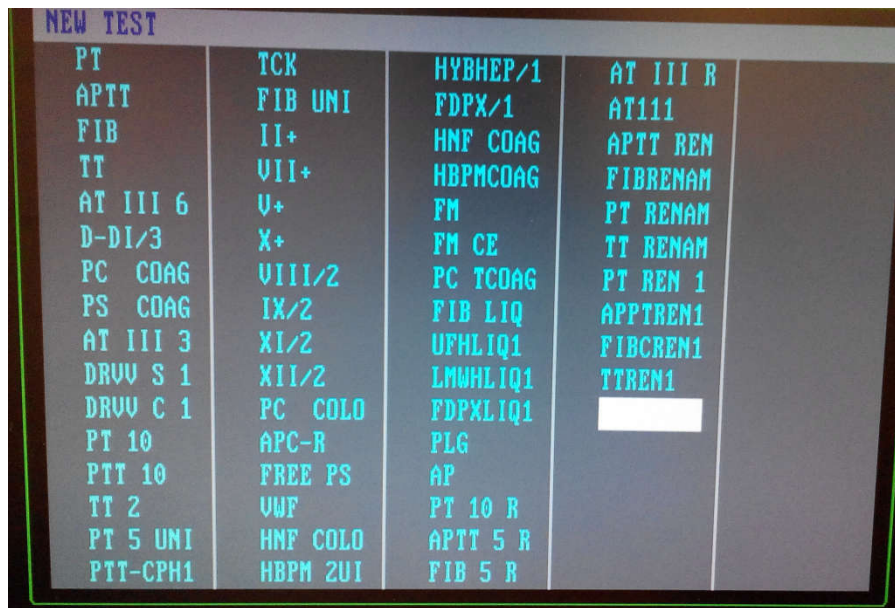


Рис. 2

Далее нажимаем клавишу **Enter** и переходим к заполнению стандартного протокола в соответствии с нижеследующими фотографиями. Протокол состоит из трех частей. Первая часть определяет объемы реагентов, их соотношение и наименование. Вторая часть определяет условия построения калибровочной кривой. Третья часть определяет условия проведения контроля качества и выдачу результатов. Следует сразу отметить, что при создании названия реагентов следует придумать несложное наименование, поскольку при дальнейшей постановке реагентов на борт прибора необходимо будет вручную вводить названия тестов в полном соответствии с их названиями в протоколе (в том числе, с учетом заглавных и прописных регистров).

Итак, переходим к заполнению всех частей протокола по представленным ниже образцам.

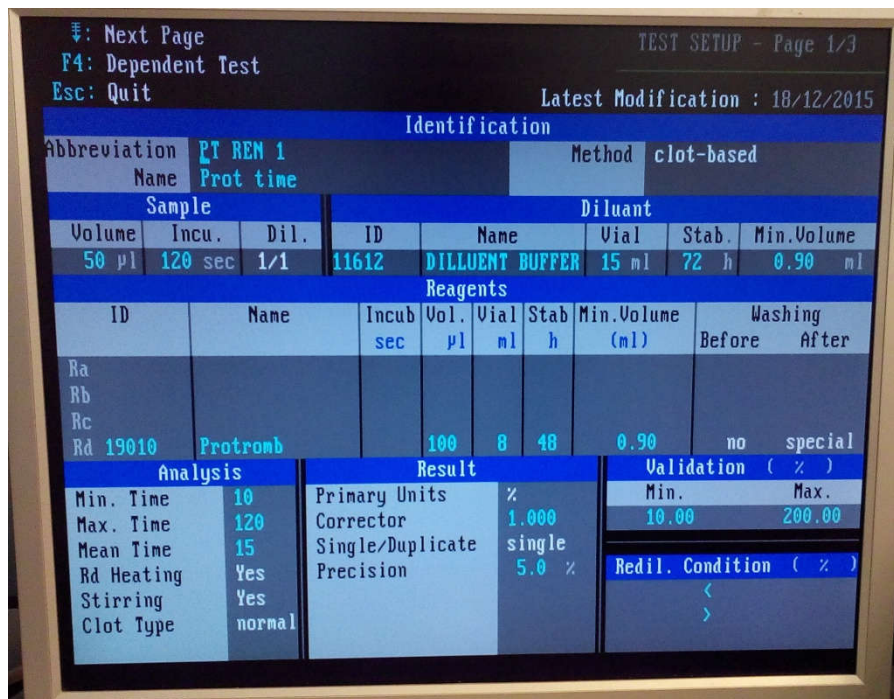


Рис. 3

Объем исследуемого образца (плазмы) составляет **50** мкл. Время инкубации **120** секунд. Объем реагента (Ренампластин) составляет 100 мкл. **Rd Heating** в положении **Yes**. **Stirring** в положении **Yes**. Остальные параметры (Объем (Vial)), минимальный объём и стабильность реагента заполняются в соответствии с параметрами реагента, который устанавливается на борту.

В графе установки параметров промывки (Washing) в позиции After ставим промывку **Special** путем нажатия на клавишу Del. После нажатия данной клавиши Вы попадаете в окно настройки параметров промывки (рис.4). В данном окне, помимо установки параметра Special (в графе After), пишем код в графе Desorb: **1227**. Прибор автоматически заполнит остальные поля. Выходим нажатием клавиши **Esc**.

Washing	Ra	Rb	Rc	Rd
Before				DO
After				special
Pulse Intens				12227
Desorb				STA-DESORB U
Name				15 ml
Vial	ml	ml	ml	120 h
Stability	h	h	h	0.90 ml
Min.Volume	ml	ml	ml	

Washing	Sample
After	normal
Pulse Intens	5
Desorb	
Name	
Vial	ml
Stability	h
Min.Volume	ml

Rd Heating	Yes	Precision	5.0 %	Redil. Condition (%)
Stirring	Yes			<
Clot Type	normal			>

DEL = Modify

Рис. 4.

Затем нажатием клавиши **Page Down** переходим во второе окно.

CALIBRATION

MODE Graph - Linear regression

Calibrators							Scale	
ID	Key	Name	Dil.	Vial ml	Stab h	Min. Volume ml	Measures Concentrations	Lin Inv
19002		Cal Plasma ren	1/1	1	4	0.50	Single/Duplicate	
19002		Cal Plasma ren	1/2	1	4	0.50	single	
19002		Cal Plasma ren	1/3	1	4	0.50		
19002		Cal Plasma ren	1/4	1	4	0.50		

Controls						
	ID	Key	Name	Vial ml	Stab. h	Min. Volume (ml)
Level 1	11379		PRECICLOT +I	1	8	0.50
Level 2	11380		PRECICLOT +II	1	8	0.50

DEL = Modify

Рис. 5

В данном окне задаются разведения плазмы-калибратора. Для построения калибровочной кривой рекомендуется задать 3-4 разведения плазмы-калибратора в следующих вариантах: 1/1;1/2;1/4 или 1/1;1/2;1/3;1/4. В качестве буфера для разведения на борту прибора используется физиологический раствор (0,9 % раствор NaCl). Физиологический раствор используется **только** для калибровки и не используется в процессе анализа. После калибровки целесообразно на постоянной основе установить на борт прибора имидазоловый буфер, который будет использоваться при определении уровня фибриногена и активности антитромбина III.

PT REN 1: Prot time

Printout / Transmission					Usual Values (%)	
	Unit	Convers. Factor	Print.	Transmission Test Number	Min.	Max.
Main	%		Yes	0	70.00	130.00
Aux. 1	INR		Yes	0	Printout Limits	
Aux. 2	sec.		Yes	0	Min.	10.00 %
Aux. 3					Max.	170.00

Quality Control				Period	Vial	Stab.	Min. Volume
	ID	Key	Name	h	ml	h	(ml)
Level 1	11379		PRECICLOT +I	24	1	8	0.50
Level 2	11380		PRECICLOT +II	24	1	8	0.50
Level 3							

DEL = Modify

Рис. 6.

В третьей части протокола вносятся названия контрольных материалов (Level 1, Level 2), а также периодичность выполнения контрольных измерений (Period). Также выбираются единицы представления результатов измерений (сек, %, МНО (INR)).

После внесения всех данных нажимаем **Esc** и выбираем **Save and Exit**. Для подтверждения изменения протокола программное обеспечение запросит подтверждающий пароль: обычно это **CQ** или **QX**. После сохранения протокола и выхода из меню Setup прибор выполняет перезагрузку. Затем можно переходить к процессу калибровки прибора.

Установка реагентов на борт прибора

Перед проведением теста протромбиновое время необходимо провести предварительную калибровку прибора. Калибровка теста проводится каждый раз при изменении серии реагента (Ренампластин), а также в том случае, если результаты контроля качества выходят за пределы допустимого диапазона значений.

Перед проведением процесса калибровки необходимо установить реагенты на борт прибора. Для этого в основном меню нажимаем F2 или выбираем пункт меню **Loading/Products** (рис. 4). Выезжает блок для установки реагентов.

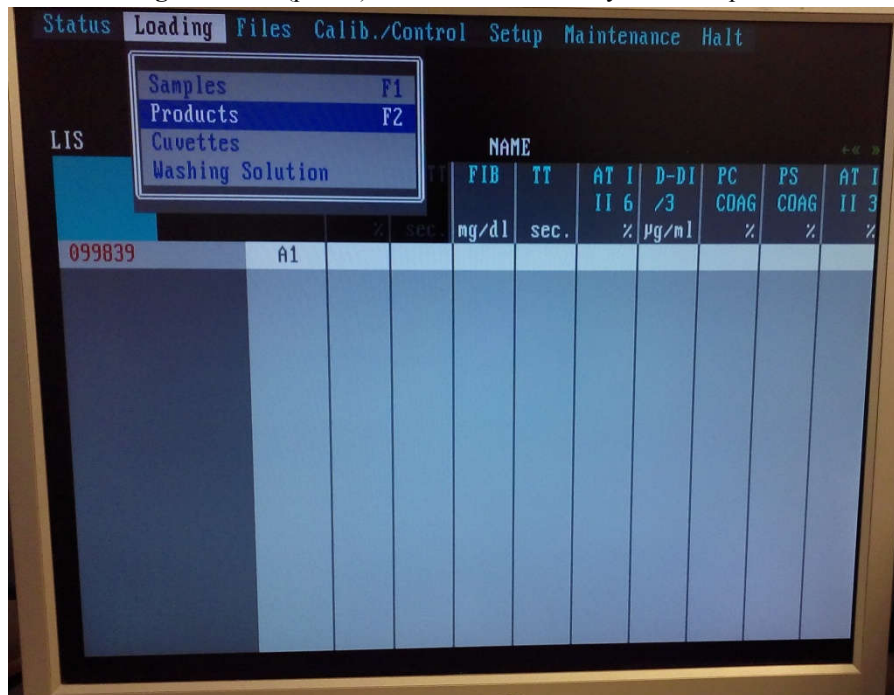


Рис. 7

Перед непосредственной постановкой реагентов на борт необходимо ввести в строку внизу экрана следующие параметры:

Параметр	Пример
ID реагента	19001
Name (наименование реагента в соответствии с наименованием в протоколе данного теста)	Prot Cal
Vial, ml (объем реагента)	1
Stab, h (стабильность реагента)	8
Lot (серия реагента) (указана на упаковке и этикетке флакона)	3715
Position (Позиция реагента на борту)	28

ID реагента выбирается в произвольном порядке. Важно, чтобы ID реагента, не повторял уже сохраненные ID в памяти прибора. Удобно использовать цифры после 19000, например: 19001 или 19002.

Позиция на борту выбирается произвольно в зависимости от наличия свободных ячеек.

После реконструкции (разведения) реагента и перед установкой на борт прибора Ренампластин желательно прогреть при 37 °С, в течение 30-40 мин для обеспечения лучшей стабильности.

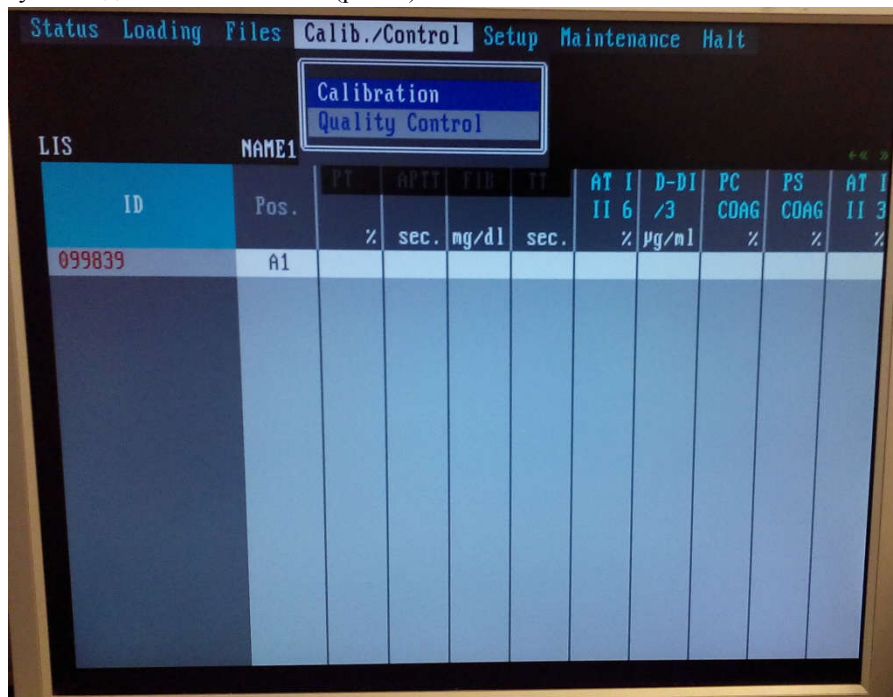
При необходимости перемешивания реагента (например, Ренампластин) при появлении сообщения **Product should be mixed?** набираем на клавиатуре **Yes** и нажимаем **Enter**. Устанавливаем флакон с реагентом на борт прибора в соответствующую позицию. На данную процедуру отводится несколько секунд. Если по истечении данного времени флакон не был установлен в соответствующую позицию, прибор сбрасывает введенную ранее информацию по данному реагенту. Необходимо также помнить, что позиции для перемешивания реагента располагаются на борту под номерами **23, 24**. Также не стоит забывать помещать в реагент магнитную мешалку.

Из всех реагентов торговой марки Ренам перемешивание требуется только для реагента Ренампластин.

Буферы и разбавители устанавливаются в блок для образцов, поэтому чтобы установить на борт физиологический раствор, в основном меню нажимаем **F1** или выбираем пункт меню **Loading/Samples**. В нижней строке вводим все параметры (ID, название и т.д.), которые соответствуют настройкам буфера для разведения (в данном случае физиологический раствор), заданным ранее в параметре теста.

Построение калибровочной прямой

Для проведения калибровки выбираем в основном меню пункт **Calib./Control** и пункт подменю **Calibration**. (рис. 8)



The screenshot shows a menu-driven interface with the following menu items at the top: Status, Loading, Files, Calib./Control (highlighted), Setup, Maintenance, Halt. A sub-menu is open under 'Calib./Control', showing 'Calibration' (highlighted) and 'Quality Control'. Below the menu is a table with columns for various parameters and their units.

LIS		NAME1		PT		APTT		FIB		TT		AT I		D-DI		PC		PS		AT I	
ID	Pos.			%	sec.	mg/dl	sec.					II 6	/3	COAG	COAG	II 3					
				%	sec.	mg/dl	sec.					%	µg/ml	%	%	%					%
099839	A1																				

Рис. 8

Из списка тестов выбираем тест, который хотим откалибровать (например, PT renam).



Рис. 9

Нажимаем **Enter**. Появляется окно калибровки теста (рис. 9).

Нажимаем **Esc** и выбираем меню **Calibrate**. Появляется следующее окно.

F10 Calibrate
Esc Quit

CALIBRATION
Prot time

CALIBRATORS				
Id	Name	Lot	Dilution	Concentration
19002	Cal Plasma ren	3515	1/1	94 %
19002	Cal Plasma ren	3515	1/2	47.00
19002	Cal Plasma ren	3515	1/3	31.33
19002	Cal Plasma ren	3515	1/4	23.50
CONTROLS				
				Range (%)
Id	Name	Lot	Min.	Max. Orig. Values
11379	PRECICLOT +I	3515	85	105 [-1000]
11380	PRECICLOT +II	9515	48	57 [-1000]
REAGENTS				
Id	Name	Lot		
			ISI	1.15
19010	Protromb	5615		

Рис. 10

Устанавливаем значение активности протромбина в процентах от нормы, указанное в паспорте к плазме-калибратору, в данном случае, **97 %**. (рис. 10).

После установки всех необходимых параметров запускаем процесс калибровки нажатием клавиши **F10**. Прибор выполняет калибровку, затем проводит измерения в контрольных материалах.

Ниже можно увидеть пример калибровочного графика:

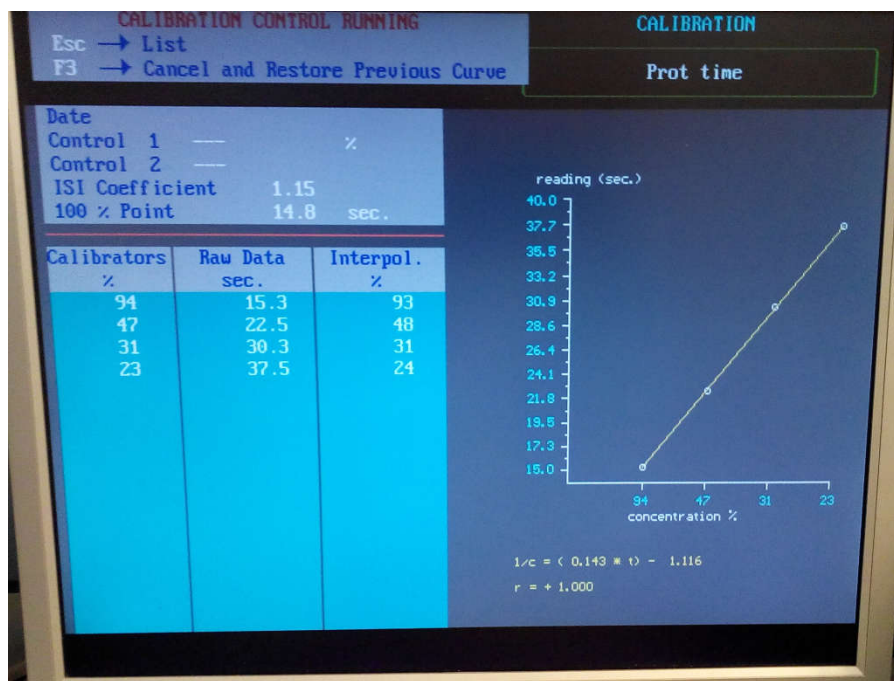


Рис. 11

Затем нажимаем **Esc** и заходим в подменю **Modify 100% Point – ISI**. Устанавливаем значение МИЧ, указанное в паспорте к плазме-калибратору и среднее нормальное протромбиновое время ($PB_{100\%}$). Если пользователя устраивает результат построения калибровочной прямой и значения контрольных измерений не выходят за допустимые пределы, то нажимаем **Quit**. Если есть необходимость корректировки калибровочной кривой, то производим повторную калибровку прибора или корректировку параметра $PB_{100\%}$ в меню **Modify 100% Point – ISI**. Этот параметр рассчитывается прибором автоматически на основании построенного калибровочного графика. Также его можно рассчитать вручную по формуле:

$$PB_{100\%} = \frac{PB_K}{ПО_K}, \text{ где}$$

PB_K – протромбиновое время плазмы-калибратора (без разведения) – 1 точка на калибровочном графике.

$ПО_K$ – протромбиновое отношение плазмы-калибратора (указано в паспорте к плазме-калибратору)

Пример расчета:

Активность протромбина в % от нормы в плазме-калибраторе составляет 105%, а ПО составляет 0,97. При проведении калибровки для первой точки (105%,

плазма без разведения) было получено протромбиновое время 16,5 секунд. Тогда $PВ_{100\%} = 16,5 / 0,97 = 17,0$ (сек).

Произведя расчет, вносим полученный результат в строку 100% point в подменю **Modify 100% Point – ISI**. После изменения 100% точки прибор автоматически производит повторные измерения в контрольных материалах и если все измерения укладываются в установленный диапазон, принимает новую калибровочную прямую.

При получении результатов контрольных измерений, не укладывающихся в допустимый диапазон, прибор выдает ошибку, а соответствующие значения помечаются красным цветом.

Анализ исследуемых образцов

Для загрузки пациентов на борт прибора нажимаем **F1** или выбираем пункт меню **Loading/Samples**.

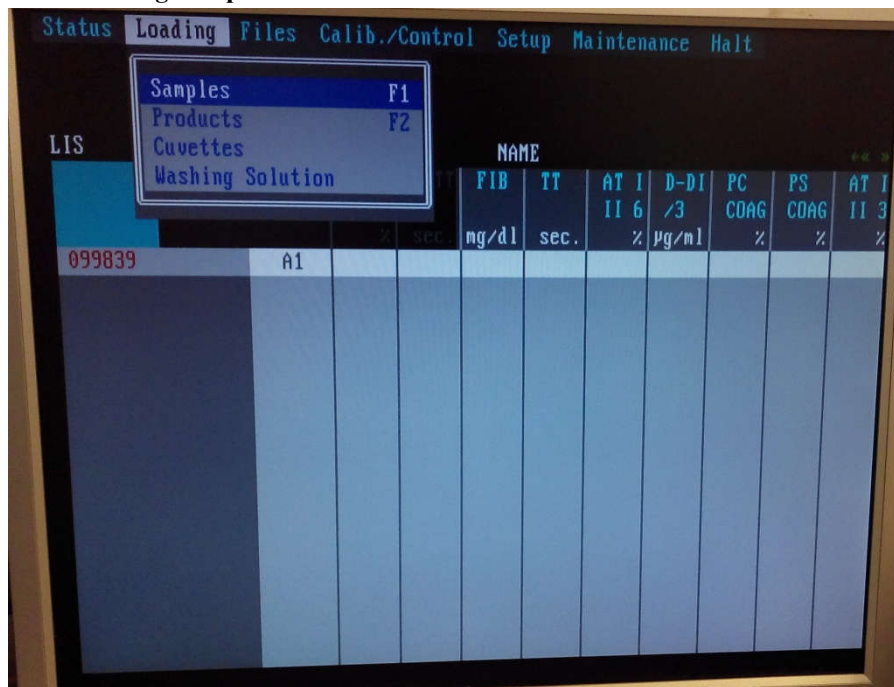


Рис. 12

Для каждого загружаемого пациента после его постановки на борт необходимо отметить тесты, которые прибор должен выполнить для данного пациента. Список тестов представлен в правой нижней части экрана. Выбор

осуществляется путем нажатия клавиш →, ↑, ←, ↓. Поскольку созданные тесты обычно находятся в конце списка, то существует возможность быстрого перехода к нужным тестам путем нажатия клавиши **Page Down**. После выбора тестов сохраняем их в памяти прибора нажатием клавиши **F10**. Строка с данным пациентом появляется в верхней части экрана. Это означает, что данный пациент внесен в память прибора. После загрузки всех пациентов закрываем данный блок нажатием клавиши **Esc**. При появлении главного меню снова нажимаем **Esc**. На экране появляется надпись **Block Sample Pipetting**. Выбираем **No**. Прибор автоматически запускает исследование пациентов и выдает результаты.

Интерпретация результатов

Нормальная область.

Протромбиновое время – 14-18 секунд.

Процент протромбина по Квику – 70-130%.

Международное Нормализованное Отношение – 0,85-1,26.

Протромбиновый индекс – 90-105%.

Терапевтическая область.

Показания	Рекомендуемая терапевтическая область МНО	% протромбина по Квику для Ренампластина
Тромбоз глубоких вен Легочная эмболия Инфаркт миокарда	2,0 – 3,0	50 – 30
Искусственные клапаны сердца Рекуррентная системная эмболия	3,0 – 4,5 или 2,5 – 3,5	30 – 20 или 35 – 25

Определение активированного частичного тромбопластинового времени (АРТТ-МВ)

Для оценки активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) с помощью прибора Roche STA Compact НПО РЕНАМ рекомендует использовать АЧТВ-тест (кат. № ПГ-7/1). Рекомендуется использовать методику определения АЧТВ по созданному тесту на основе протокола **АРТТ-МВ** (АРТТ).

В качестве контроля в нормальной области рекомендуется использовать контрольную плазму «Плазма Н» (кат. № КМ-1), аттестованную по шести основным параметрам (ПВ, АЧТВ, ТВ, УФ, АТ III) в нормальной и патологической областях.





ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) является одним из наиболее распространенных и чувствительных тестов для выявления широкого диапазона коагуляционных нарушений. АЧТВ изменяется в зависимости от различных количеств фибриногена, активности протромбина, факторов V, VIII, IX, X, XI, XII, других факторов контакта, присутствия специфических ингибиторов факторов свертывания VIII и IX. АЧТВ является широко применяемым методом контроля эффективности парентерального введения гепарина. При этом время свертывания увеличивается пропорционально уровню гепарина. У пациентов, принимающих пероральные антикоагулянты, снижаются уровни циркуляции факторов II, VII, IX и X, поэтому АЧТВ может увеличиваться. В присутствии неспецифических ингибиторов, например волчаночного антикоагулянта, АЧТВ может удлиниться.

Набор реагентов предназначен для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

АЧТВ-реагент, лиофиленно высушенный (4 мл) – 7 флаконов, Кальция хлорид 0,025 М раствор (10 мл) – 3 флакона.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 560 анализов плазмы крови при расходе по 50 мкл реагентов на один анализ или 280 анализов плазмы крови при расходе по 100 мкл реагентов на один анализ.

Принцип метода

К исследуемой плазме крови последовательно добавляют АЧТВ-реагент, представляющий собой водный раствор эллаговой кислоты (активатор внутреннего пути свертывания) в комплексе с соевыми фосфолипидами и хлорид кальция. В процессе измерения АЧТВ регистрируют время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения АЧТВ: билирубин в концентрации до 0,2 г/л; гемоглобин (свободный) – до 1 г/л; триглицериды – до 1,2 г/л. Уменьшение активности факторов внутреннего пути свертывания ниже 50% приводит к увеличению АЧТВ до патологических значений.

Результаты определения АЧТВ могут зависеть от назначаемых препаратов. Эстрогены у мужчин и оральные контрацептивы у женщин снижают значения АЧТВ. Препараты дифенина, гепарина, варфарина, гирудина и других прямых ингибиторов тромбина могут повышать АЧТВ.

На результаты определения АЧТВ влияет выбор антикоагулянта и соблюдение точного соотношения антикоагулянт:кровь.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения АЧТВ в одной пробе плазмы одним набором не превышает 5%. Коэффициент вариации результатов определения АЧТВ в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 5%.

Нормальный диапазон значений АЧТВ, полученный при определении АЧТВ у не менее 100 здоровых доноров, составляет в среднем 25–35 сек и указан в паспорте для каждой серии набора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен для диагностики in vitro. Класс опасности 2а.

При работе с набором реагентов следует соблюдать правила, описанные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Инструкция утверждена Минздравом СССР в 1991 г.).

При работе с исследуемыми образцами крови пациентов 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.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, вместимостью 50–200 мкл и 200–1000 мкл;
- термобяга на 37°C и секундомер (для ручного определения);
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов АЧТВ-тест предназначен для определения АЧТВ в плазме человеческой крови.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стекляннной поверхностью.

Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре (18–25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше -20°C. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2-х месяцев.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2–8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18–20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Ограничения по использованию биологического материала

При скрининге пациентов на присутствие неспецифических ингибиторов свертывания (волчаночный антикоагулянт) тромбоциты или тромбоцитарные фрагменты в исследуемой плазме влияют на результаты анализа, маскируя нарушения коагуляционных тестов, вызванные присутствием волчаночного антикоагулянта. Для исследований необходимо использовать плазму крови, лишенную тромбоцитов, полученную двойным центрифугированием.

После первого центрифугирования плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. Немедленно после центрифугирования перенести верхний слой плазмы (не более половины объема) в пластиковую пробирку. Остаточное содержание тромбоцитов в плазме не должно превышать 1000/μл плазмы.

Плазму, содержащую нефракционированный гепарин, следует центрифугировать не позднее чем через один час после получения крови, хранить при комнатной температуре и проанализировать не позднее, чем через 4 часа.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

АЧТВ-реагент. АЧТВ-реагент представляет собой лиофильно высушенный реагент на основе соевых фосфолипидов и активатора – эллаговой кислоты. Внести во флакон с АЧТВ-реагентом 4 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

Кальция хлорида 0,025 М раствор. Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть при 37°C. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения АЧТВ.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу измерения.
- Считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом на термометре

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма контрольная (исследуемая), мкл	50
АЧТВ-реагент, мкл	50
Инкубировать при 37°C точно 3 мин.	
Кальция хлорида 0,025 М раствор, мкл	50

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

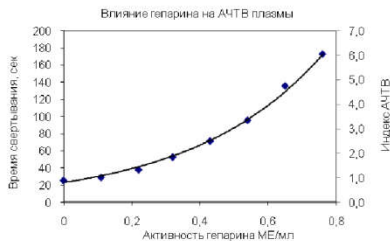
В процессе измерения АЧТВ зарегистрировать время от момента добавления в кювету коагулометра раствора кальция хлорида до момента образования сгустка.

Результаты измерения активированного частичного тромбопластинного времени пациента должны включаться в отчет как «АЧТВ в секундах». Эти результаты должны соотноситься с нормальным диапазоном значений АЧТВ, принятым в лаборатории для данного реагента, который также должен быть включен в отчет.

Значения АЧТВ контрольной плазмы никогда не должны использоваться в качестве нормального диапазона.

АЧТВ-реагент чувствителен к присутствию гепарина, поэтому его возможно использовать в качестве реагента, позволяющего проводить мониторинг гепаринотерапии.

На графике приведен пример зависимости времени свертывания плазмы от содержания в ней различного количества нефракционированного гепарина, полученного с использованием конкретной серии АЧТВ-реагента.



Следует учитывать, что:

- Время от взятия образца крови до проведения анализа должно быть не более 1 часа, так как период полураспада нефракционированного гепарина составляет около 1,5 ч.
- Образец крови для анализа должен быть отобран таким образом, чтобы предотвратить агрегацию и активацию тромбоцитов с последующим выбросом фактора PF4, инактивирующего гепарин.

- Когда возможно, следует до начала терапии гепарином установить базовые показатели АЧТВ пациента.

- Значения АЧТВ могут меняться в зависимости от используемых методик, оборудования, партий реагента и гепарина, поэтому каждой лаборатории следует принять собственные терапевтические диапазоны, и проверить их при изменении одного из перечисленных факторов.

АЧТВ-реагент можно использовать при определении активностей факторов внутреннего пути свертывания.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укупованном виде при температуре 2-8°C.

Транспортирование набора допускается при температуре +18-25°C в течение 2 недель.

Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупованном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Реагент	+2-8°C	+18-25°C	-18-20°C
АЧТВ-реагент	14 суток	1 сутки	2 мес.

Стабильность кальция хлорида 0,025М раствора

До окончания срока хранения в закрытом виде	+2-8°C	+18-25°C	+37°C
			8 часов

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические АЧТВ следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н производства НПО РЕНАМ, код КМ-1.

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 Набором АЧТВ-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на ¼, завязывают, маркируют надписью: «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.

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

Пример паспорта к набору АЧТВ-тест

Серия № 9912

Годеи до 07.14

№ п/п	Наименование показателя	По ТУ № 9398-017-05595541-2009	Фактическое значение
1	Внешний вид АЧТВ-реагента	Пористая масса серого цвета	Соответствует
2	Внешний вид кальция хлорида 0,025 М раствора	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
3	Растворимость АЧТВ-реагента, минут, не более	1	Соответствует
4	АЧТВ здоровых доноров, сек		24 - 34
5	Кэффициент вариации результатов определения АЧТВ, % не более	10	Соответствует
6	Допустимое отклонение продолжительности АЧТВ от аттестованного значения, % не более	10	Соответствует

Программирование прибора

В режиме ожидания (отсутствие заданий) нажимаем клавишу **Esc** и в открывшемся меню выбираем пункт меню **Setup/Tests**. В открывшемся окне необходимо перевести курсор в конец списка, на пустую строку, для создания нового протокола. Это можно сделать путем нажатия клавиши **End**. Далее нажимаем клавишу **Enter** и переходим к заполнению стандартного протокола в соответствии с нижеследующими фотографиями. Протокол состоит из трех частей. Первая часть определяет объемы реагентов, их соотношение и наименование. Вторая часть определяет условия построения калибровочной кривой. Третья часть определяет условия проведения контроля качества и выдачу результатов. Следует сразу отметить, что при создании названия реагентов следует придумать несложное наименование, поскольку при дальнейшей постановке реагентов на борт прибора необходимо будет вручную вводить названия тестов в полном соответствии с их названиями в протоколе (в том числе, с учетом заглавных и прописных регистров).

Итак, переходим к заполнению всех частей протокола по представленным ниже образцам.

Next Page
F4: Dependent Test
Esc: Quit

TEST SETUP - Page 1/3
Latest Modification : 18/12/2015

Identification									
Abbreviation					Method				
APPTREM1					clot-based				
Name									
APTT									
Sample			Diluent						
Volume	Incu.	Dil.	ID	Name	Vial	Stab.	Min.Volume		
50 µl	0 sec	1/1	11612	DILUENT BUFFER	15 ml	72 h	0.90 ml		
Reagents									
ID	Name	Incub sec	Vol. µl	Vial ml	Stab h	Min.Volume (ml)	Washing		
Ra 19007	APTT ren	180	50	4	72	0.70	no	normal	
Rb									
Rc									
Rd 19008	Ca ren		50	10	72	0.90	no	normal	
Analysis			Result			Validation (sec.)			
Min. Time	10	Primary Units	sec.		Min.		Max.		
Max. Time	240	Corrector	1.000		10.00		240.00		
Mean Time	29	Single/Duplicate	single						
Rd Heating	no	Precision	5.0 %		Redil. Condition (sec.)				
Stirring	no			<					
Clot Type	normal			>					

Рис. 13.

Объем исследуемого образца (плазмы) составляет **50** мкл. Время инкубации **180** секунд. Объем реагента R_a (АЧТВ-реагент) составляет 50 мкл. Объем реагента

R_d (CaCl₂) составляет **50** мкл. **Rd Heating** в положении **No**. **Stirring** в положении **No**. Остальные параметры (Объем (Vial)), минимальный объем и стабильность реагента заполняются в соответствии с параметрами реагента, который устанавливается на борт.

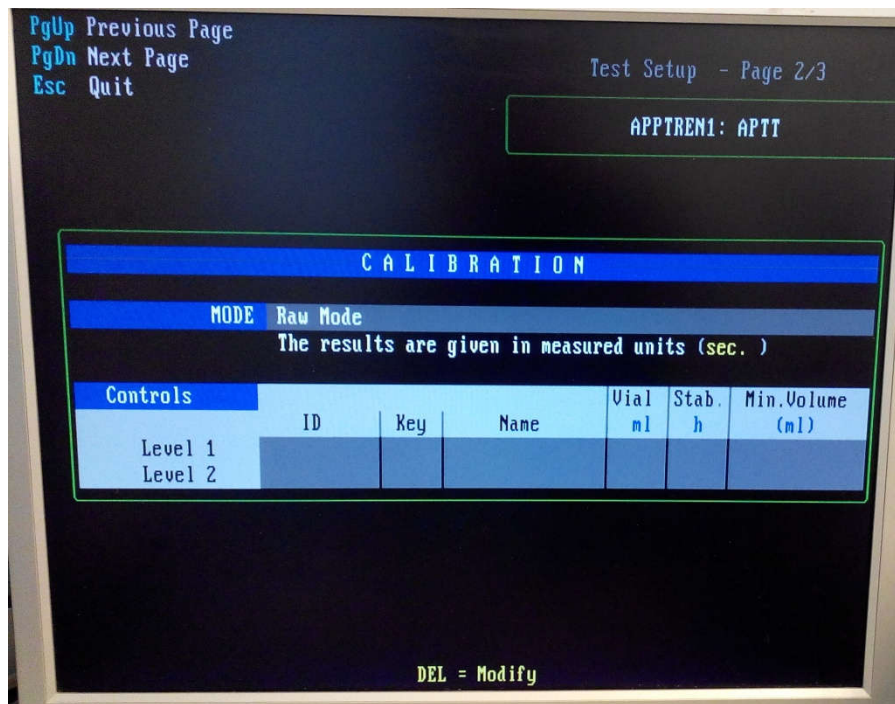


Рис. 14

В данном окне задаются разведения плазмы-калибратора. Поскольку для определения АЧТВ калибровочный график не используется, то второе окно не заполняется.

APPTREN1: AP11

Printout / Transmission					Usual Values (sec.)	
	Unit	Convers. Factor	Print.	Transmission Test Number	Min.	Max.
Main	sec.		Yes	0	24.00	34.00
Aux. 1	-				Printout Limits	
Aux. 2					Min.	10.00 sec.
Aux. 3					Max.	240.00

Quality Control				Period	Vial	Stab.	Min. Volume
	ID	Key	Name	h	ml	h	(ml)
Level 1	11379		PRECICLOT +I	24	1	8	0.50
Level 2	11380		PRECICLOT +II	24	1	8	0.50
Level 3							

DEL = Modify

Рис. 15.

В третьей части протокола вносятся названия контрольных материалов (Level 1, Level 2), а также периодичность выполнения контрольных измерений (Period). Также выбираются единицы представления результатов измерений (сек, Ratio). После внесения всех данных нажимаем **Esc** и выбираем **Save and Exit**. Для подтверждения изменения протокола программное обеспечение запросит подтверждающий пароль: обычно это CQ или QX. После сохранения протокола и выхода из меню Setup прибор выполняет перезагрузку. Затем можно переходить к проведению контроля качества.

Установка реагентов на борт прибора

Перед проведением контроля качества необходимо установить реагенты на борт прибора. Для этого в основном меню нажимаем **F2** или выбираем пункт меню **Loading/Products**. Выезжает блок для установки реагентов

Перед непосредственной постановкой реагентов на борт необходимо ввести в строку внизу экрана следующие параметры:

Параметр	Пример
ID реагента	19004
Name (наименование реагента в соответствии с наименованием в протоколе данного теста)	АРТТ ren
Vial, ml (объем реагента)	4
Stab, h (стабильность реагента)	48
Lot (серия реагента) (указана на упаковке и этикетке флакона)	1812
Position (Позиция реагента на борту)	32

ID реагента выбирается в произвольном порядке. Важно, чтобы ID реагента не повторял уже сохраненные ID в памяти прибора. Удобно использовать цифры после 19000, например: 19001 или 19002 и т.д.

Позиция на борту выбирается произвольно в зависимости от наличия свободных ячеек.

После установки всех параметров в случае появления сообщения **Product should be mixed?** набираем на клавиатуре **No** и нажимаем **Enter**. Устанавливаем флакон с реагентом на борт прибора в соответствующую позицию. На данную процедуру отводится несколько секунд. Если по истечении данного времени флакон не был установлен в соответствующую позицию, прибор сбрасывает введенную ранее информацию по данному реагенту.

Проведение контроля качества

Прибор автоматически проводит контроль качества по заданным параметрам в протоколах теста перед началом измерения пациентов, а также регулярно, согласно установленным интервалам в протоколе теста (обычно интервал соответствует 24 часам). Если есть необходимость провести внеочередной контроль качества, то это можно сделать, нажав Esc, затем пункт меню Calib./Control и далее Quality Control. После этого откроется окно со списком тестов, в котором необходимо выбрать тест APTT REN (в данном случае). Красными иконками помечаются тесты, которые не прошли, или не проходили контроль качества. Белыми иконками помечаются тесты, для которых контроль качества выполнен. Желтыми иконками помечаются тесты, для которых установлено задание на проведение контроля качества (рис. 16). Данная маркировка действительна и для меню калибровки тестов.

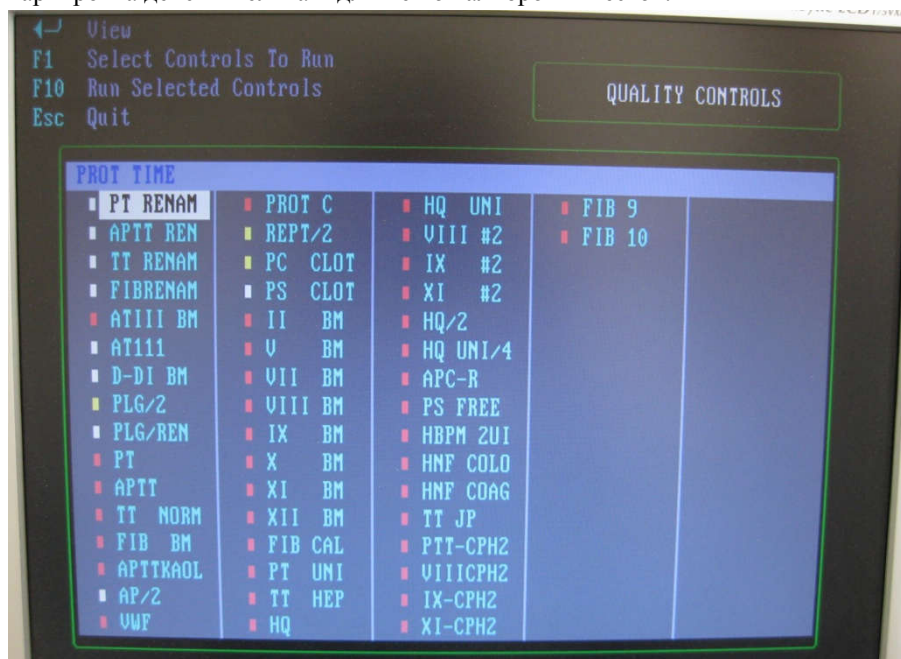


Рис. 16.

Нажав **Enter**, входим в меню контроля качества данного теста. Здесь отображаются все контрольные измерения, а также в этом меню можно менять параметры контрольных карт (верхний/нижний предел и т.д.). Переключения между контрольными картами уровня в нормальной и патологической областях осуществляются нажатиями клавиш F2 и F3.

Ниже можно увидеть пример контрольных карт на протромбиновое и тромбиновое время:

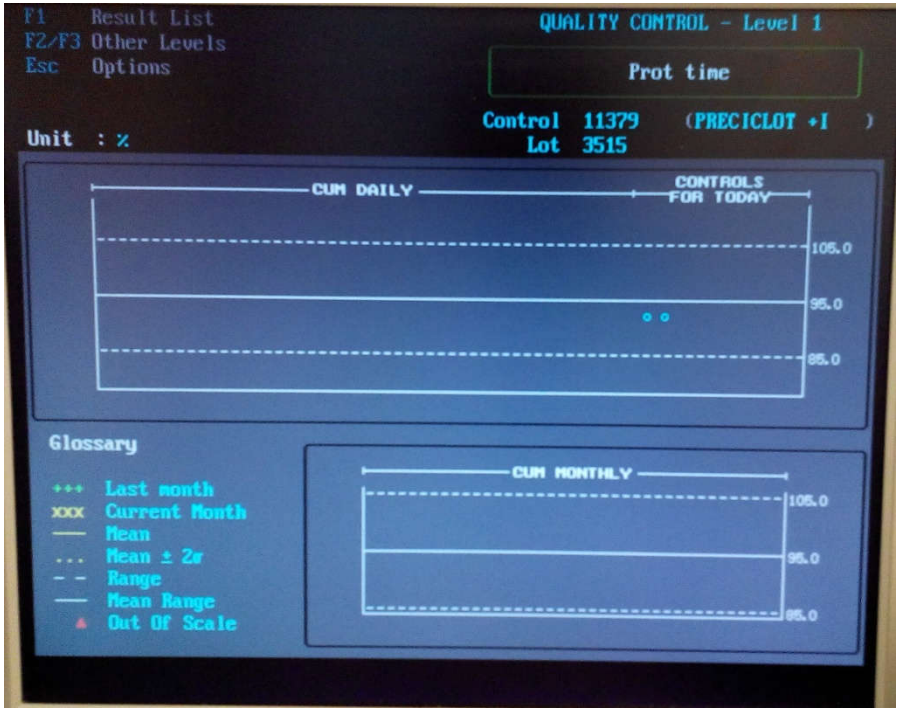


Рис. 17



Рис. 18

Анализ исследуемых образцов

Для загрузки пациентов на борт прибора нажимаем **F1** или выбираем пункт меню **Loading/Samples**.

Для каждого загружаемого образца после его постановки на борт необходимо отметить тесты, которые прибор должен выполнить для данного пациента. Список тестов представлен в правой нижней части экрана. Выбор осуществляется путем нажатия клавиш \rightarrow , \uparrow , \leftarrow , \downarrow . Поскольку созданные тесты обычно находятся в конце списка, то существует возможность быстрого перехода к нужным тестам путем нажатия клавиши **Page Down**. После выбора тестов сохраняем их в памяти прибора нажатием клавиши **F10**. Строка с данным пациентом появляется в верхней части экрана. Это означает, что данный пациент внесен в память прибора. После загрузки всех пациентов закрываем данный блок нажатием клавиши **Esc**. При появлении главного меню снова нажимаем **Esc**. На экране появляется надпись **Block Sample Pipetting**. Выбираем **No**. Прибор автоматически запускает контроль качества, затем переходит к исследованию пациентов и выдает результаты.

Интерпретация полученных результатов.

АЧТВ-реагент не чувствителен к волчаночному антикоагулянту.

АЧТВ-реагент чувствителен к присутствию гепарина. Возможно использовать в качестве реагента, позволяющего проводить мониторинг гепаринотерапии.

АЧТВ-реагент можно использовать при определении активностей факторов внутреннего пути свертывания.

В норме АЧТВ составляет **24-34** секунды.

Определение уровня фибриногена по Клауссу (FIB-MB)

Для определения уровня фибриногена по методу Клаусса с помощью прибора Roche STA Compact НПО РЕНАМ рекомендует использовать Фибриноген-тест (кат. № ПГ-10/1). Рекомендуется использовать методику определения уровня фибриногена по созданному тесту на основе протокола **FIB-MB** (FIB).

В качестве плазмы-калибратора рекомендуется использовать плазму-калибратор, входящую в состав набора Фибриноген-тест. Также возможно использование плазмы-калибратора «Мультикалибратор» (кат. № КМ-16).

В качестве контроля в нормальной области рекомендуется использовать контрольную плазму «Плазма Н» (кат. № КМ-1), аттестованную по шести основным параметрам (ПВ, АЧТВ, ТВ, УФ, АТ III) в нормальной и патологической областях.





ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения содержания фибриногена (Фибриноген-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Определение содержания фибриногена в плазме крови человека является одним из основных тестов при исследовании гемостаза. Тест предназначен для измерения содержания фибриногена в плазме при гиперфибриногемии, которая связана с тяжестью воспалительных, иммунных, деструктивных процессов, а также является одним из факторов повышенного риска развития гиперкоагуляционного синдрома, артериальных тромбозов и инфарктов органов, а также при остром ДВС-синдроме, при лечении фибринолитиками, при врожденных гипо- и дисфибриногемиях. Набор реагентов предназначен для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

1. Тромбин человека, лиофильно высушенный (2 мл) - 8 флаконов;
2. Плазма-калибратор, лиофильно высушенная (1 мл) - 1 флакон;
3. Буфер имидазоловый концентрированный (5 мл) - 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 320 анализов при расходе 50 мкл тромбина на один анализ или 160 анализов при расходе 100 мкл тромбина на один анализ.

Принцип метода. Измеряется время свертывания разбавленной в 10 раз цитратной плазмы крови при добавлении избытка тромбина. В этой системе время образования сгустка фибрина зависит только от концентрации в плазме фибриногена, определяемой по калибровочному графику разведений плазмы-калибратора с установленным содержанием фибриногена.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

В специально разработанной Клауссом системе с избытком тромбина и сильным разведением исследуемой плазмы время образование сгустка фибрина определяется только активным фибриногеном. Следующие вещества не влияют на правильность определения фибриногена: билирубин в концентрации до 0,6 г/л, свободный гемоглобин – до 5 г/л, триглицериды – до 6 г/л и нефракционированный гепарин – до 1 МЕ/мл. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно заниженных результатов.

Чувствительность

В норме содержание фибриногена составляет 1,8 – 4,0 г/л.

В зависимости от чувствительности коагулометра метод позволяет определять 0,6 г/л фибриногена.

Воспроизводимость

Допустимое отклонение содержания фибриногена в плазме-калибраторе от аттестованного значения не более 5%.

Коэффициент вариации результатов определения не превышает 5%. Допустимый разброс результатов определения концентрации фибриногена в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Точные значения содержания фибриногена в плазме-калибраторе устанавливают при аттестации каждой серии и указывают в паспорте.

Линейность

Линейность определения от 0,6 до 6,0 г/л

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*. Класс опасности 2а.

При работе с набором реагентов следует соблюдать правила, описанные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Инструкция утверждена Минздравом СССР в 1991 г.).

При работе с исследуемыми образцами крови пациентов 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.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М) или
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- вода дистиллированная;
- мерный цилиндр;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов Фибриноген-тест предназначен для определения концентрации фибриногена в плазме человеческой крови.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стеклянными поверхностями.

Процедура получения биологического материала

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 г).

Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше -20°C. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2-х месяцев.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре (18-25°C) и не более 8 ч при температуре 2-8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

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.

Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочий буферный раствор. Буфер имидазоловый концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерную емкость, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). Рабочий буферный раствор хранить при температуре +2-8°C не более 1 месяца.

Тромбин для определения фибриногена. Тромбин человека, лиофильно высушенный с активностью около 50 МЕ/мл. Внести во флакон с лиофильно высушенным тромбином 2 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при помешивании. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Раствор плазмы-калибратора. Во флакон с плазмой-калибратором ввести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Раствор готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ




Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения фибриногена по методу Клаусса.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу измерения.
- Считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре

Построение калибровочного графика

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить следующие разведения плазмы-калибратора:

Пробирка, №	1	2	3	4
Содержание фибриногена в плазме-калибраторе, г/л	2A*	A	0,5A	0,25A
Рабочий буферный раствор, мл	0,8	0,5	0,5	0,5
Раствор плазмы-калибратора, мл	0,2	-	-	-
Перемешать и перенести в пробирку, мл				-
	0,5	0,5	0,5	

*A – содержание фибриногена в плазме-калибраторе указано в паспорте на набор.

Проведение анализа

Исследуемую плазму больного развести рабочим буферным раствором в 10 раз.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Разведенная плазма-калибратор (исследуемая), мкл	100
Инкубировать при 37°C точно 2 минуты.	
Тромбин для определения фибриногена, мкл	50

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрируют время от момента добавления тромбина до момента образования сгустка.

- Для полуавтоматических и автоматических коагулологических анализаторов следует воспользоваться программой Фибриноген-тест соответствующего анализатора.
- Для некоторых полуавтоматических коагулометров следует в меню настройки прибора выбрать чувствительность, соответствующую данному тесту.
- Для полуавтоматических коагулометров следует обратить внимание на рекомендации производителя по разведениям плазмы-калибратора и исследуемых образцов.
- Калибровочный график должен быть построен для каждой серии реагентов.
- При построении калибровочного графика вручную значения содержания фибриногена в разведениях плазмы-калибратора в г/л, отложить на ось X билогарифмической координатной сетки, прилагаемой к инструкции. На ось Y отложить значения времени свертывания каждого разведенного образца плазмы-калибратора в секундах. Через полученные точки провести калибровочный график, который должен представлять собой прямую линию в диапазоне концентраций фибриногена от 0,6 – 1,0 до 5 – 6 г/л в зависимости от чувствительности коагулометра. По калибровочному графику определить содержание фибриногена в плазме пациента в г/л.
- При анализе плазмы пациентов с высоким (более 4,0 г/л) содержанием фибриногена развести плазму в 20 раз, а полученное по графику значение умножить на 2. Если содержание фибриногена в плазме пациента около 1,0 г/л, для уточнения полученного результата необходимо развести плазму в 5 раз и полученный результат разделить на 2.
- В состав тромбина входит ингибитор гепарина, что позволяет использовать данный реагент для измерения содержания фибриногена на фоне гепаринотерапии.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения содержания фибриногена следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н, код КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укуленном виде при температуре 2-8°C. Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укуленном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Реагенты	+2-8°C	+18-25°C	-18-20°C
Раствор тромбина	14 суток	2 суток	2 месяца
Раствор плазмы – калибратора	8 часов	4 часа	2 месяца
Буферный раствор	1 месяц	-	-

Транспортирование наборов должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание наборов не допускается.

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 набором реагентов «Фибриноген-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на ¾, завязывают, маркируют надписью: «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.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по 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

Пример паспорта к набору Фибриноген-тест

Набора реагентов для определения содержания фибриногена
Фибриноген-тест

Серия № 3615

Годен до:11.17

№ п/п	Наименование показателя	По ТУ № 9398-264-05595541-02	Фактическое значение
1	Внешний вид тромбина	Пористая масса белого цвета	Соответствует
2	Внешний вид буфера имидазолового концентрированного с.0415	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
3	Внешний вид плазмы-калибратора	Пористая масса желтого цвета	Соответствует
4	Растворимость тромбина и плазмы-калибратора, мин. не более	3	Соответствует
5	Содержание фибриногена в плазме-калибраторе, г/л Плазма-калибратор сер. 3315	1,8 – 3,5	2,50
6	Допустимое отклонение содержания фибриногена в плазме-калибраторе от аттестованного значения, % не более	5	Соответствует
7	Чувствительность, г/л не более	0,9	Соответствует
8	Линейность в диапазоне концентраций 0.6-5.0 г/л отклонение в % не более	5	Соответствует
9	Коэффициент вариации результатов определения, % не более	5	Соответствует

ОТК

Разработчик и изготовитель:
МБОУИ Общество больных гемофилией
НПО РЕНАМ
125167 Москва, Новый Зыковский пр., 4
тел. (495) 225-1261, (499) 707-76-30

Программирование прибора

В режиме ожидания (отсутствие заданий) нажимаем клавишу **Esc** и в открывшемся меню выбираем пункт меню **Setup/Tests**. В открывшемся окне

необходимо перевести курсор в конец списка, на пустую строчку, для создания нового протокола. Это можно сделать путем нажатия клавиши **End**. Далее нажимаем клавишу **Enter** и переходим к заполнению стандартного протокола в соответствии с нижеследующими фотографиями. Протокол состоит из трех частей. Первая часть определяет объемы реагентов, их соотношение и наименование. Вторая часть определяет условия построения калибровочной кривой. Третья часть определяет условия проведения контроля качества и выдачу результатов. Следует сразу отметить, что при создании названия реагентов следует придумать несложное наименование, поскольку при дальнейшей постановке реагентов на борт прибора необходимо будет вручную вводить названия тестов в полном соответствии с их названиями в протоколе (в том числе, с учетом заглавных и прописных регистров).

Итак, переходим к заполнению всех частей протокола по представленным ниже образцам.

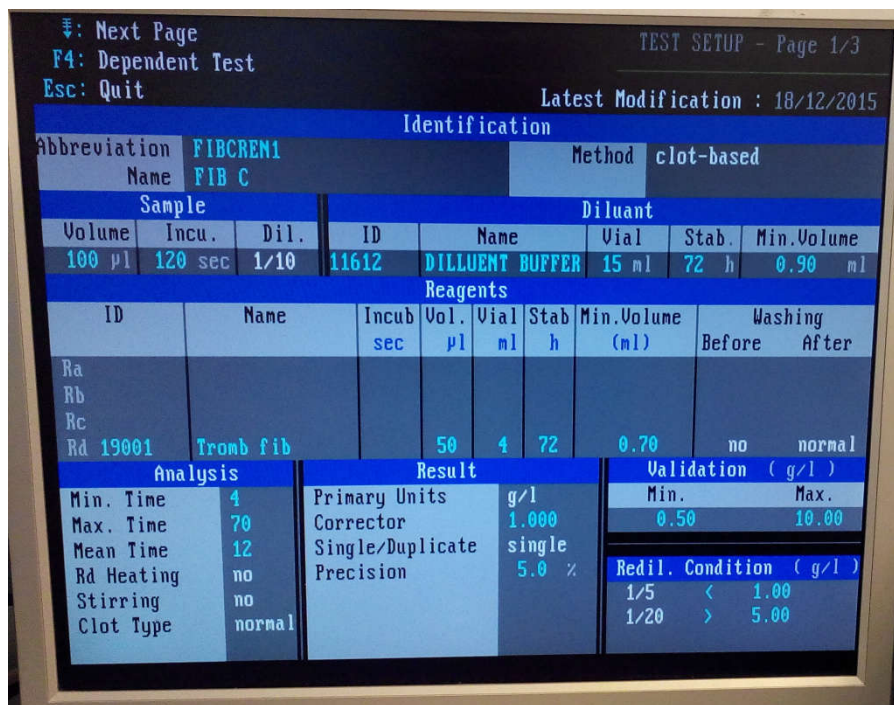


Рис. 19.

Объем исследуемого образца (плазмы) составляет **100** мкл. Время инкубации **120** секунд. Предварительное разведение **1/10**. Объем реагента (тромбин для определения фибриногена) составляет **50** мкл. **Rd Heating** в положении **No**. **Stirring** в положении **No**. Остальные параметры (Объем (Vial)), минимальный

объем и стабильность реагента заполняются в соответствии с параметрами реагента, который устанавливается на борту.

Переходим к заполнению следующего окна нажатием клавиши **Page Down**.

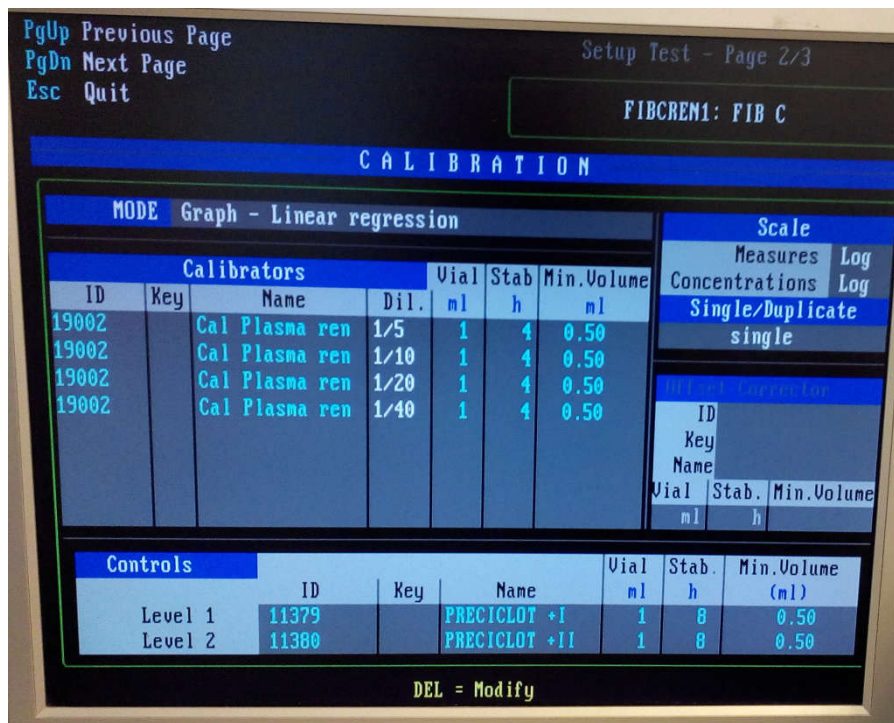


Рис. 20.

В данном окне задаются разведения плазмы-калибратора. Для построения калибровочной кривой рекомендуется задать 4 разведения плазмы-калибратора в следующих вариантах: 1/5;1/10;1/20;1/40. В качестве буфера для разведения используется рабочий раствор имидазолового буфера, который входит в набор.

Переходим к заполнению следующего окна нажатием клавиши **Page Down**.

FIBCREM1: FIB C

Printout / Transmission					Usual Values (g/l)	
	Unit	Convers. Factor	Print.	Transmission Test Number	Min.	Max.
Main	g/l		Yes	0	2.00	4.00
Aux. 1	sec.		Yes	0		
Aux. 2						
Aux. 3						
Printout Limits						
					Min. 0.60 g/l	
					Max. 10.00	

Quality Control				Period	Vial	Stab.	Min. Volume
	ID	Key	Name	h	ml	h	(ml)
Level 1	11379		PRECICLOT +I	24	1	8	0.50
Level 2	11380		PRECICLOT +II	24	1	8	0.50
Level 3							

DEL = Modify

Рис. 21.

В третьей части протокола вносятся названия контрольных материалов, а также периодичность выполнения контрольных измерений. Также выбираются единицы представления результатов измерений (г/л, сек).

После внесения всех данных нажимаем **Esc** и выбираем **Save and Exit**. Для подтверждения изменения протокола программное обеспечение запросит подтверждающий пароль: обычно это CQ или QX. После сохранения протокола прибор выполняет перезагрузку. Затем можно переходить к процессу калибровки прибора.

Установка реагентов на борт прибора

Перед проведением теста на определение уровня фибриногена необходимо провести предварительную калибровку прибора. Калибровка теста проводится каждый раз при изменении серии реагента (тромбин для определения фибриногена, имидазоловый буфер), а также в том случае, если результаты контроля качества выходят за пределы допустимого диапазона значений.

Перед проведением процесса калибровки необходимо установить реагенты на борт прибора. Для этого в основном меню нажимаем **F2** или выбираем пункт меню **Loading/Products**.

Перед непосредственной постановкой реагентов на борт необходимо ввести в строку внизу экрана следующие параметры:

Параметр	Пример
ID реагента	19006
Name (наименование реагента в соответствии с наименованием в протоколе данного теста)	Thrombin Fib
Vial, ml (объем реагента)	2
Stab, h (стабильность реагента)	48
Lot (серия реагента) (указана на упаковке и этикетке флакона)	3815
Position (Позиция реагента на борту)	34

ID реагента выбирается в произвольном порядке. Важно, чтобы ID реагента не повторял уже сохраненные ID в памяти прибора. Удобно использовать цифры после 19000, например: 19001 или 19002 и т.д.

Позиция на борту выбирается произвольно в зависимости от наличия свободных ячеек.

После установки всех параметров в случае появления сообщения **Product should be mixed?** набираем на клавиатуре **No** и нажимаем **Enter**. Устанавливаем флакон с реагентом на борт прибора в соответствующую позицию. На данную процедуру отводится несколько секунд. Если по истечении данного времени флакон не был установлен в соответствующую позицию, прибор сбрасывает введенную ранее информацию по данному реагенту.

Буфера и разбавители устанавливаются в блок для образцов, поэтому чтобы установить на борт рабочий раствор имидазолового буфера в основном меню нажимаем **F1** или выбираем пункт меню **Loading/Samples**. В нижней строке вводим все параметры, которые соответствуют настройкам буфера для

разведения (в данном случае имидазоловый буфер), заданным ранее на первой странице в протоколе теста.

Построение калибровочной прямой

Для проведения калибровки выбираем в основном меню пункт **Calib./Control** и пункт подменю **Calibration**.

Выбираем тест, который хотим откалибровать (например, FIB renam)

Далее входим в пункт меню **Calibrate**, в котором устанавливаем значение содержания фибриногена в плазме-калибраторе, указанное в паспорте к набору Фибриноген - тест.

ВАЖНО! Значение вносится в строку с разведением **1/10**.

После установки всех необходимых параметров запускаем процесс калибровки нажатием на клавишу **F10**. Прибор выполняет калибровку, затем проводит измерения в контрольных материалах. Если пользователя устраивает результат построения калибровочной прямой и значения контрольных измерений не выходят за допустимые пределы, то нажимаем **Quit**. Если есть необходимость корректировки калибровочной кривой, то производим повторную калибровку прибора.

При получении результатов контрольных измерений, не укладывающихся в допустимый диапазон, прибор выдает ошибку, а соответствующие значения помечаются красным цветом.

Пример построения калибровочной кривой можно увидеть на рис. 22.

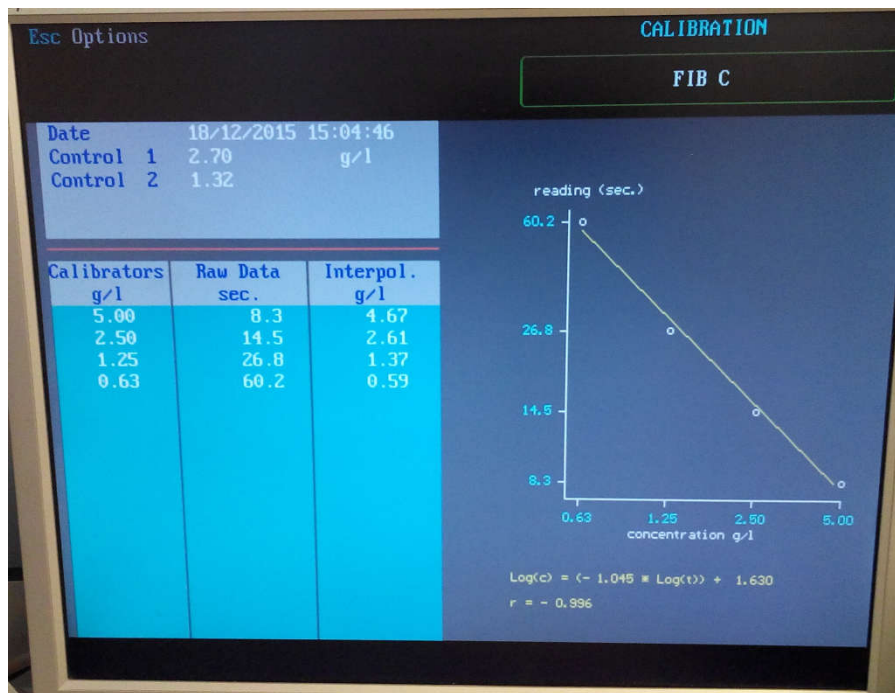


Рис. 22

Анализ исследуемых образцов

Для загрузки пациентов на борт прибора нажимаем **F1** или выбираем пункт меню **Loading/Samples**.

Для каждого загружаемого пациента после его постановки на борт необходимо отметить тесты, которые прибор должен выполнить для данного пациента. Список тестов представлен в правой нижней части экрана. Выбор осуществляется путем нажатия клавиш →, ↑, ←, ↓. Поскольку, созданные тесты обычно находятся в конце списка, то существует возможность быстрого перехода к нужным тестам путем нажатия клавиши Page Down. После выбора тестов сохраняем их в памяти прибора нажатием клавиши **F10**. Строка с данным пациентом появляется в верхней части экрана. Это означает, что данный пациент внесен в память прибора. После загрузки всех пациентов закрываем данный блок нажатием клавиши **Esc**.

Интерпретация результатов.

В норме содержание фибриногена составляет 1,8 – 4 г/л.

Определение тромбинового времени (ТТ-МВ)

Для оценки тромбинового времени (ТВ) с помощью автоматического коагулометра Roche STA Compact НПО РЕНАМ рекомендует использовать Тромбин-реагент (кат. № ПГ-9А). Рекомендуется использовать методику определения тромбинового времени по созданному тесту на основе протокола **ТТ-МВ (ТТ)**.

В качестве контроля в нормальной области рекомендуется использовать контрольную плазму «Плазма Н» (кат. № КМ-1), аттестованную по шести основным параметрам (ПВ, АЧТВ, ТВ, УФ, АТ III) в нормальной и патологической областях.



**ИНСТРУКЦИЯ****по применению Набора реагентов для определения тромбинового времени (Тромбин-реагент)****НАЗНАЧЕНИЕ**

Тест тромбиновое время предназначен для оценки конечного этапа свертывания крови, т.е. скорости превращения фибриногена, для определения функциональной активности фибриногена и ингибиторов тромбина в плазме, таких как:

- ✓ продукты деградации фибрина/фибриногена;
- ✓ гепарин и гепариноиды;
- ✓ при фибринолитической терапии.

Набор реагентов предназначен для работы на всех типах полуавтоматических и автоматических коагулометров.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**Состав набора**

Тромбин-реагент лиофильно высушенный - 9 флаконов;

Растворитель для тромбин-реагента,

концентрат (6 мл)

1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 180 анализов при использовании тромбина с активностью 9 МЕ/мл, 270 анализов при использовании тромбина с активностью 6 МЕ/мл и 540 анализов при использовании тромбина с активностью 3 МЕ/мл при расходе реагента по 100 мкл на анализ.

Принцип метода

Метод основан на определении времени образования фибринового сгустка при добавлении к плазме раствора тромбина необходимой активности.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения фибриногена: билирубин в концентрации до 0,2 г/л, свободный гемоглобин – до 5 г/л, триглицериды – до 5 г/л

Определение тромбинового времени используется для контроля за гепаринотерапией и фибринолитической терапией, для диагностики активации фибринолиза.

Укорочение тромбинового времени наблюдается при гиперфибриногенемии (концентрация фибриногена более 6 г/л).

Удлинение тромбинового времени наблюдается при гипо- и дисфибриногенемиях; гепаринотерапии; наличии ингибиторов полимеризации фибрина (парапротенинов, продуктов деградации фибрина/фибриногена и др.); тромболитической терапии (например, при применении урокиназы, стрептокиназы).

Нормальная область времени свертывания составляет:

- при активности тромбина 9 МЕ/мл - 7–9 сек.
- при активности тромбина 6 МЕ/мл - 9–12 сек;
- при активности тромбина 3 МЕ/мл - 15–20 сек;

Чувствительность Тромбина к гепарину

Все рабочие растворы тромбина чувствительны к присутствию гепарина в исследуемой плазме, для мониторинга за введением гепарина рекомендуется использовать тромбин с активностью 9 МЕ/мл. Тест тромбиновое время не зависит от внешней и внутренней системы активации, но зависит от концентрации фибриногена, наличия аномального фибриногена, от активности антитромбинов, процессов полимеризации и стабилизации фибрина.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения тромбинового времени не превышает 5%.

Допустимый разброс результатов определения тромбинового времени в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен для диагностики in vitro.

Класс опасности 2а.

При работе с набором реагентов следует соблюдать правила, описанные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Инструкция утверждена Минздравом СССР в 1991 г.). При работе с исследуемыми образцами крови пациентов 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 вирус иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- центрифуга лабораторная;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50–200 мкл и 200–1000 мкл;
- цилиндр мерный, объемом 100 мл;
- термобаня на 37°C и секундомер (для ручного определения);
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3,8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М);
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**Вид анализируемого биологического материала**

Набор реагентов Тромбин-реагент предназначен для определения тромбинового 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) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре (18–25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше -20°C. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2-х месяцев.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2–8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18–20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес.

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. Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растворитель для тромбин-реагента. 6 мл концентрата растворителя для тромбин-реагента перенести в мерный цилиндр, довести дистиллированной водой до объема 60 мл и тщательно перемешать. Хранить при температуре 2-8°C не более 1 месяца.

Тромбин-реагент

В зависимости от необходимой активности тромбина внести во флакон с лиофильно высушенным тромбин-реагентом следующее количество растворителя (см. таблицу).

Активность, МЕ/мл	Объем растворителя, мл
9	2
6	3
3	6

Тромбин-реагент готов к проведению анализа через 15 минут после приготовления. Тромбин-реагент перед анализом не прогревать при температуре 37°C.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения тромбинового времени.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу измерения.
- Считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом на термобане

Внести в кювету анализатора или в пробирку на термобане:	Объем, мкл
Плазма исследуемая (контрольная)	100
Инкубировать при температуре 37°C точно 2 мин.	
Рабочий раствор тромбина	100

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе измерения тромбинового времени регистрировать время от момента добавления к шпиральной плазме тромбина до момента образования сгустка.

Стандартизация Тромбина

Каждая серия Тромбина для определения тромбинового времени аттестована по активности в МЕ/мл против вторичного Международного стандарта по процедуре, утвержденной Европейской Фармакопеей. Пределы времени свертывания в контрольной плазме с активностью тромбина 3, 6 и 9 МЕ /мл указаны в паспорте на набор.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения содержания фибриногена следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н, код КМ-1.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укупоренном виде при температуре 2-8°C. Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

Активность МЕ/мл	2-8°C	18-25°C	-18-20°C*
9	3 сут	1 сут	2 мес.
6	3 сут	1 сут	2 мес.
3	3 сут	1 сут	2 мес.

Транспортирование наборов должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание наборов не допускается.

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 Набором Тромбин-реагент с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на ¼, завязывают, маркируют надписью: «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.

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

Программирование прибора

В режиме ожидания (отсутствие заданий) нажимаем клавишу **Esc** и в открывшемся меню выбираем пункт меню **Setup/Tests**. В открывшемся окне необходимо перевести курсор в конец списка, на пустую строчку, для создания нового протокола. Это можно сделать путем нажатия клавиши **End**. Далее нажимаем клавишу **Enter** и переходим к заполнению стандартного протокола в соответствии с нижеследующими фотографиями. Протокол состоит из трех частей. Первая часть определяет объемы реагентов, их соотношение и наименование. Вторая часть определяет условия построения калибровочной кривой. Третья часть определяет условия проведения контроля качества и выдачу результатов. Следует сразу отметить, что при создании названия реагентов следует придумать несложное наименование, поскольку при дальнейшей постановке реагентов на борт прибора необходимо будет вручную вводить названия тестов в полном соответствии с их названиями в протоколе (в том числе, с учетом заглавных и прописных регистров).

Итак, переходим к заполнению всех частей протокола по представленным ниже образцам.

Abbreviation		Name		Method			
↓: Next Page		TTREMI		clot-based			
F4: Dependent Test		TT					
Esc: Quit							
TEST SETUP - Page 1/3							
Latest Modification : 18/12/2015							
Identification							
Sample			Diluant				
Volume	Incu.	Dil.	ID	Name	Vial	Stab.	Min.Volume
75 µl	120 sec	1/1	11612	DILUENT BUFFER	15 ml	72 h	0.90 ml
Reagents							
ID	Name	Incub	Vol.	Vial	Stab	Min.Volume	Washing
		sec	µl	ml	h	(ml)	Before After
Ra							
Rb							
Rc							
Rd	19011 Tromb ren		75	6	24	0.90	no normal
Analysis		Result			Validation (sec.)		
Min. Time	6	Primary Units	sec.		Min.	Max.	
Max. Time	200	Corrector	1.000		10.00	150.00	
Mean Time	17	Single/Duplicate	single				
Rd Heating	no	Precision	5.0 %		Redil. Condition (sec.)		
Stirring	no				<		
Clot Type	normal				>		

Рис. 23.

Объем исследуемого образца (плазмы) составляет **75** мкл. Время инкубации **120** секунд. Объем реагента (тромбин) составляет 75 мкл. **Rd Heating** в положении **No. Stirring** в положении **No.** Остальные параметры (Объем (Vial)), минимальный объем и стабильность реагента заполняются в соответствии с параметрами реагента, который устанавливается на борту.

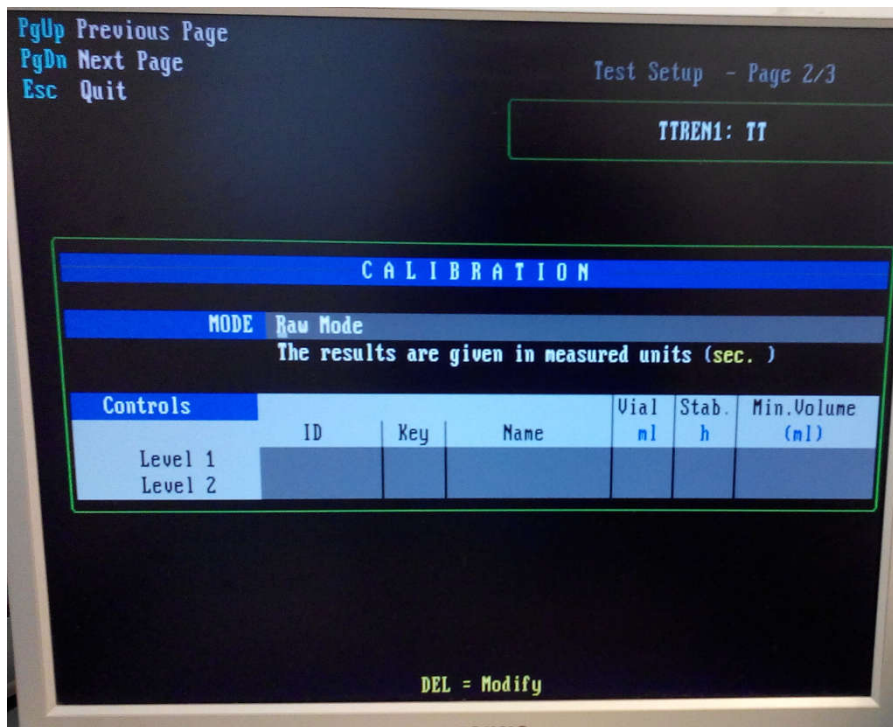


Рис. 24.

В данном окне задаются разведения плазмы-калибратора. Поскольку для определения тромбинового времени калибровочный график не используется, то соответственно, второе окно не заполняется.

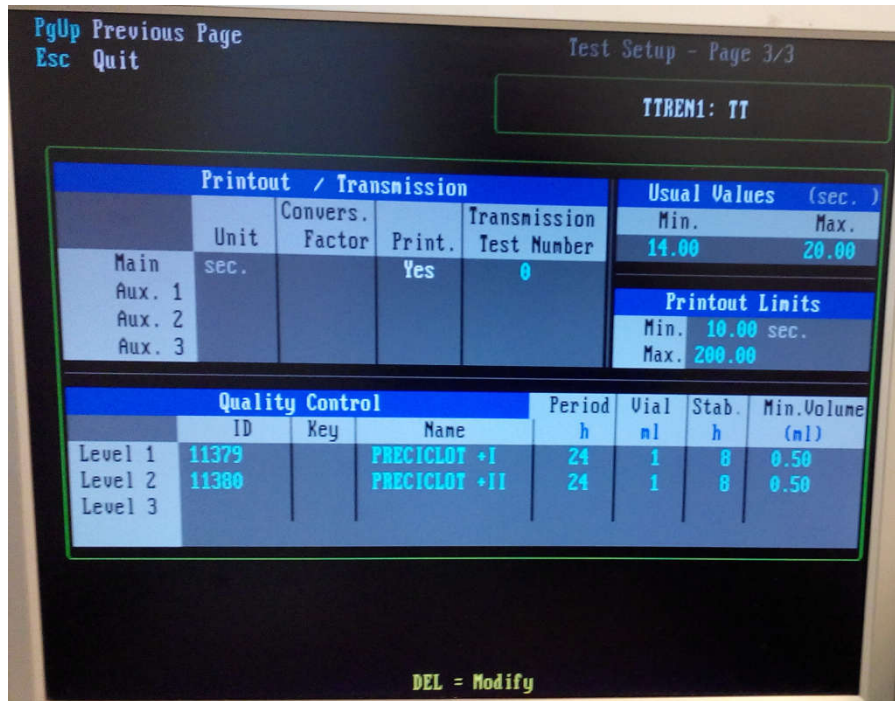


Рис. 25.

В третьей части протокола вносятся названия контрольных материалов (Level 1, Level 2), а также периодичность выполнения контрольных измерений (Period). Также выбираются единицы представления результатов измерений (сек.) После внесения всех данных нажимаем **Esc** и выбираем **Save and Exit**. Для подтверждения изменения протокола программное обеспечение запросит подтверждающий пароль: обычно это CQ или QX. После сохранения протокола прибор выполняет перезагрузку. Затем можно переходить к проведению контроля качества.

Установка реагентов на борт прибора

Перед проведением контроля качества необходимо установить реагенты на борт прибора. Для этого в основном меню нажимаем **F2** или выбираем пункт меню **Loading/Products**. Выезжает блок для установки реагентов.

Перед непосредственной постановкой реагентов на борт необходимо ввести в строку внизу экрана следующие параметры:

Параметр	Пример
ID реагента	19009
Name (наименование реагента в соответствии с наименованием в протоколе данного теста)	Thrombin renam
Vial, ml (объем реагента)	6
Stab, h (стабильность реагента)	48
Lot (серия реагента) (указана на упаковке и этикетке флакона)	3715
Position (Позиция реагента на борту)	35

ID реагента выбирается в произвольном порядке. Важно, чтобы ID реагента не повторял уже сохраненные ID в памяти прибора. Удобно использовать цифры после 19000, например: 19001 или 19002 и т.д.

Позиция на борту выбирается произвольно в зависимости от наличия свободных ячеек.

После установки всех параметров в случае появления сообщения **Product should be mixed?** набираем на клавиатуре **No** и нажимаем **Enter**. Устанавливаем флакон с реагентом на борт прибора в соответствующую позицию. На данную процедуру отводится несколько секунд. Если по истечении данного времени флакон не был установлен в соответствующую позицию, прибор сбрасывает введенную ранее информацию по данному реагенту.

Проведение контроля качества

Прибор автоматически проводит контроль качества по заданным параметрам в протоколах теста перед началом измерения пациентов, а также регулярно, согласно установленным интервалам в протоколе теста (обычно интервал соответствует 24 часам). Если есть необходимость провести внеочередной контроль качества, то это можно сделать, нажав **Esc**, далее пункт меню **Calib./Control** и пункт подменю **Quality Control**. После этого откроется окно со списком тестов, в котором необходимо выбрать тест **TT RENAM**. Красными иконками помечаются тесты, которые не прошли или не проходили контроль качества. Белыми иконками помечаются тесты, для которых контроль качества выполнен. Желтыми иконками помечаются тесты, для которых установлено задание на проведение контроля качества (рис. 26). Данная маркировка действительна и для меню калибровки тестов.

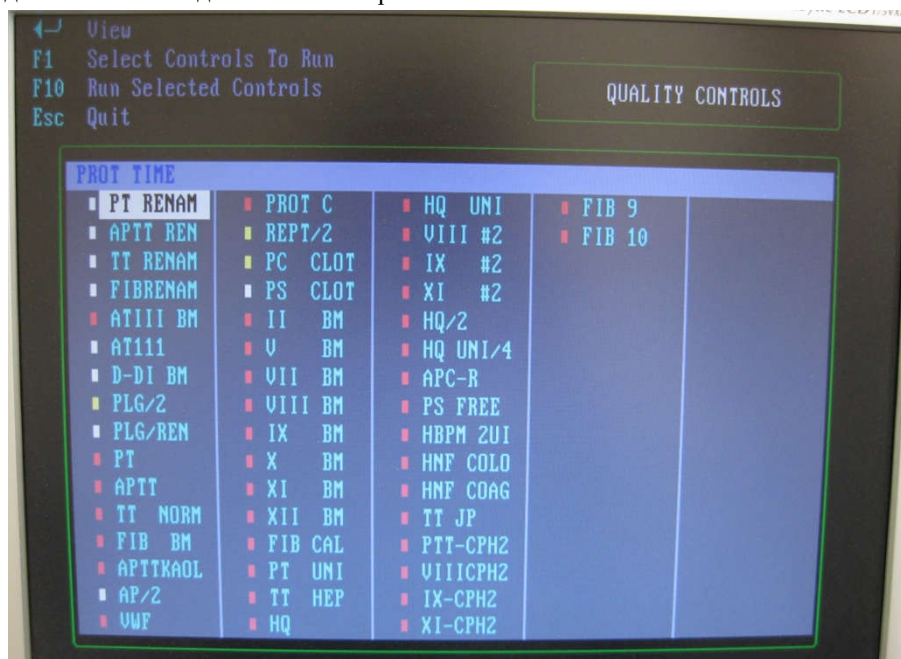


Рис. 26

Нажав **Enter**, мы входим в меню контроля качества данного теста. Здесь отображаются все контрольные измерения, а также в этом меню можно менять параметры контрольных карт (верхний/нижний предел и т.д.). Переключения между контрольными картами уровня в нормальной и патологической областях осуществляются нажатиями клавиш **F2** и **F3**. Выход из меню контроля качества осуществляется клавишей **Esc**.

Анализ исследуемых образцов

Для загрузки пациентов на борт прибора нажимаем **F1** или выбираем пункт меню **Loading/Samples**.

Для каждого загружаемого образца после его постановки на борт необходимо отметить тесты, которые прибор должен выполнить для данного пациента. Список тестов представлен в правой нижней части экрана. Выбор осуществляется путем нажатия клавиш →, ↑, ←, ↓. Поскольку созданные тесты обычно находятся в конце списка, то существует возможность быстрого перехода к нужным тестам путем нажатия клавиши **Page Down**. После выбора тестов сохраняем их в памяти прибора нажатием клавиши **F10**. Строка с данным пациентом появляется в верхней части экрана. Это означает, что данный пациент внесен в память прибора. После загрузки всех пациентов закрываем данный блок нажатием клавиши **Esc**. При появлении главного меню снова нажимаем **Esc**. На экране появляется надпись **Block Sample Pipetting**. Выбираем **No**. Прибор автоматически запускает контроль качества, затем переходит к исследованию пациентов и выдает результаты.

Интерпретация результатов.

Нормальная область для теста Тромбиновое время:

9 IU/мл	7 – 9 секунд
6 IU/мл	10 – 13 секунд
3 IU/мл	14 – 20 секунд

Таблица (пример) возможных наименований реагентов для установки на борт прибора

№	ID	Name	Vol.	Vial	Stab	Min.	Lot	Position
			μl	ml	h	Volume ml		
1	19001	Renamplastin	100	8	48	0.9	указан на флаконе	по выбору пользователя
2	19002	Cal Plasma renam	-----	1	8	0.5	указан на флаконе	по выбору пользователя
3	19003	Plasma N	-----	1	8	0.5	указан на флаконе	по выбору пользователя
4	19004	Plasma P	-----	1	8	0.5	указан на флаконе	по выбору пользователя
5	19005	APTT renam	50	4	24	0.7	указан на флаконе	по выбору пользователя
6	19006	CaCl2 renam	50	10	72	0.9	указан на флаконе	по выбору пользователя
7	19007	Thrombin fib	50	5	96	0.7	указан на флаконе	по выбору пользователя
8	19008	Tromb ren	100	6	24	0.9	указан на флаконе	по выбору пользователя
9	19009	AT tromb	100	3	168	0.7	указан на флаконе	по выбору пользователя
10	19010	AT sub	100	2	168	0.7	указан на флаконе	по выбору пользователя
11	19011	plg strep	100	2	168	0.5	указан на флаконе	по выбору пользователя
12	19012	Plg sub	50	2	168	0.5	указан на флаконе	по выбору пользователя
13	11612	DILUENT BUFFER	-----	15	72	0.9	указан на флаконе	по выбору пользователя
14	11379	PRECICLOT +I	-----	1	8	0.5	указан на флаконе	по выбору пользователя
15	11380	PRECICLOT +II	-----	1	8	0.5	указан на флаконе	по выбору пользователя

Обращаем Ваше внимание, что при вводе наименования реагента также имеет значение верхний и нижний регистр.

По всем вопросам, связанным с работой реагентов, помощью в проведении адаптаций Вы можете обращаться по бесплатному номеру телефона 8-800-200-90-57 к специалистам по продукции Кишинцу Роману Сергеевичу и Хурдину Вячеславу Викторовичу.