



ПРОТРОМБИНОВЫЙ ТЕСТ

НАЗНАЧЕНИЕ

Протромбиновый тест (ПТ) – это высокочувствительный показатель, выявляющий нарушения во внешнем пути свертывания крови. Исследование ПТ рекомендуется для:

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

Протромбиновый тест предназначен для оценки протромбинового времени свертывания.

Пригоден для мануального и автоматизированного определения.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тромбопластин (фактор III, тромбокиназа) в присутствии ионов кальция превращает протромбин плазмы крови в активный фермент тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин.

Протромбиновое время (ПВ) - время образования фибрина в плазме крови в присутствии оптимального количества кальция и избытка тканевого тромбопластина.

При таких условиях время образования сгустка фибрина зависит только от активности факторов протромбинового комплекса (факторов внешнего пути коагуляции—II, V, VII, X).

СОСТАВ НАБОРА

PT-Reagent	2 x 5 ml	6 x 5 ml
Лиофилизированный тромбопластин мозга кролика, стабилизаторы и консерванты		
Solvent	2 x 5 ml	6 x 5 ml
Буферный раствор с азидом натрия в качестве консерванта		
Calcium Chloride 0,025 mol/l	1 x 10 ml	1 x 30 ml
Забуференный хлорид кальция, 0,025 mol/l		

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Реагенты набора в нераспечатанных флаконах стабильны при 2-8°C до срока годности, указанного на этикетке.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

Центрифуга лабораторная. Дозаторы пипеточные. Водяной термостат на 37°C, таймер или коагулометр. Нормальная и патологическая плазма для контроля качества исследования (Control Plasma L1+L2). Пластиковые пробирки с 3,8 % раствором цитрата натрия.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля хода реакции и процедуры измерения рекомендуется использовать нормальную и патологическую контрольную плазму с аттестованными показателями определяемых параметров. Каждая лаборатория должна установить собственную внутреннюю систему контроля качества.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор предназначен только для диагностики in vitro. Предотвращайте контакт с кожей, глазами и одеждой. Образцы плазмы должны рассматриваться как потенциально опасные и обрабатываться как инфекционные.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Тестируемая плазма должна быть приготовлена из цельной цитратной крови. Не использовать гепарин, ЭДТА или оксалат в качестве антикоагулянта.

Сбор крови: Набрать кровь в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% цитрата натрия. Соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1.

Приготовление плазмы: Кровь центрифугировать при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови. Плазму перенести в пластиковую пробирку сразу же после центрифугирования.

Хранение образцов плазмы: при комнатной температуре (18-26°C) в течение 2 часов, в холодильнике (2-8°C) в течение 4 часов, замороженной при -20°C до 2 месяцев или при -70°C – до 6 месяцев. После заморозки образцы должны быть быстро разморожены и немедленно протестированы.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

Рабочий раствор тромбопластина: во флакон с PT-Reagent добавьте объем Solvent, указанный на этикетке флакона.

Закройте крышку и тщательно перемешайте содержимое флакона. Перед использованием инкубируйте не менее 30 минут для полной гидратации содержимого.

Стабильность восстановленного реагента в оригинальном флаконе: 8 часов при 37°C, 1 день при 22°C, 2 дня при 16°C и 5 дней при 2-8°C. **Замораживание недопустимо!**

Тромбопластин-кальциевая смесь:

Отлейте необходимый объем Calcium Chloride 0,025 mol/l, добавьте равный объем **Рабочего раствора тромбопластина** и перемешайте. Готовьте перед использованием, прогрейте не менее 15 мин при 37°C.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Процедура описана для мануального определения.

1. Внесите в маркированные пробирки по 0,1 ml образцов цитратной плазмы.
2. Содержимое пробирок инкубируйте 1,0 min при 37°C.
3. Добавьте в пробирки по 0,2 ml тромбопластин-кальциевой смеси, прогретой при 37°C.
4. Включите секундомер и отметьте время до образования сгустка фибрина.

Определение повторите 2-3 раза и используйте средний результат. Разница между результатами дубликатов должна быть менее 5 %. Повторите тест, если это необходимо.

В случае определения на коагулометре действуйте в соответствии с инструкцией к используемому коагулометру.

РАСЧЕТЫ

Результат выражают по одному из следующих вариантов:

1. Отмечают Протромбиновое Время (ПВ) в секундах образца с указанием значений, полученных при исследовании контрольной плазмы.
2. Рассчитывают Протромбиновое отношение (ПО) по формуле:

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

ПВ контрольной плазмы - время образования сгустка в нормальной плазме (специфично для каждой серии наборов, определяется каждой лабораторией и зависит от используемого оборудования).

3. Определяют активность протромбинового комплекса по Квику (% от нормы).

Для определения активности протромбинового комплекса по Квику (%) постройте калибровочный график зависимости ПВ (сек) от активности факторов протромбинового комплекса нормальной плазмы (%). Бланк калибровочного графика представлен в приложении к каждому набору.

Подготовить разведения нормальной плазмы:

№ пробы	Плазма и ее разведения +	Физиологический раствор	Разведение	Протромбин нормальной плазмы, %
1	0,25 мл +	0,0 мл	-	100
2	0,25 мл +	0,25 мл	1+1	50
3	0,25 мл пробы 2 +	0,25 мл	1+3	25

ПВ каждого разведения плазмы (сек) отложить на оси абсцисс (X), % протромбина по Квику на оси ординат (Y).

ПВ каждого разведения плазмы (сек) отложить на оси абсцисс (X), % протромбина по Квику на оси ординат (Y).

4. Для больных, получающих пероральные антикоагулянты, рассчитывают Международное нормализованное отношение (МНО), International Normalized Ratio (INR)

Для расчета МНО используется следующая формула:

МНО = **ПО**^{МИЧ}, или по таблице расчета МНО, приведенной в приложении для каждого набора.

МИЧ = международный индекс чувствительности тромбопластина, специфичный для каждого лота.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- ✓ Для предотвращения ложных результатов гарантируйте соотношение крови и антикоагулянта 9:1.
- ✓ Образцы не должны контактировать со стеклом.
- ✓ Не инкубируйте образцы при 37°C дольше, чем 5 минут для предотвращения потери V и VII фактора. Потеря V фактора может вести к удлинению ПВ.
- ✓ Не допускается анализ плазмы, имеющей сгустки, гемолиз, избыток цитрата натрия и полученной более 2 часов назад.
- ✓ ПВ может быть удлинено рядом веществ, включая кортикостероиды, ЭДТА, оральные контрацептивы, аспарагиназа, клофибрат, эритромицин, этанол, тетрациклин и антикоагулянты, такие как гепарин и кумарин.
- ✓ Укорочение ПВ вызывают антигистамины, фенобарбитал, кофеин и витамин К.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Результаты определения ПВ зависят от метода регистрации времени образования сгустка.

ПВ тест, выполненный с нормальной плазмой, будет давать время образования сгустка в пределах 13-15 секунд на фотооптическом коагулометре, от 11 до 15 секунд на механическом коагулометре и 12-15 секунд при мануальном определении.

У новорожденных младенцев ПВ удлинено на 2-3 сек, у недоношенных младенцев – на 3-5 сек.

Каждая лаборатория должна установить референтный интервал, используя индивидуальные плазмы пациентов, репрезентативные для своей популяции.

Новый референтный интервал должен устанавливаться при любых изменениях инструментальной техники, техники взятия крови или антикоагулянта.

Интервал среднего референтного ПВ должен устанавливаться заново или проверяться при смене серии набора.

Протромбиновый индекс (ПИ): 90-105 %

Протромбиновое отношение (ПО): 0,9 – 1,1

Протромбин по Квику в % (по графику) – 70-125 %.

МНО ~ 1 *

* Референтные значения изменяются в зависимости от МИЧ тромбопластина

Диапазон МНО при лечении пероральными антикоагулянтами

Показания	МНО	Протромбин по Квику, %
Профилактика и лечение венозных тромбозов, ТЭЛА, инфарктов миокарда, тканевые протезы клапанов сердца	2,0-3,0	36-23
Больные высокого риска (повторные тромбозы, механические клапаны сердца)	2,5-3,5	28 - 19

Для выражения результатов протромбинового теста рекомендуется использовать МНО и протромбин по Квику (%)

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

ПИ является коагуляционной пробой, позволяющей обнаружить плазменные дефекты «внешнего пути» образования тромбoplastина. ПИ снижается при дефиците факторов VII, X, V, II, при дефиците фибриногена (< 1,0 g/l), а также при избытке антикоагулянтов – антитромбинов.

Снижение ПИ наблюдается при заболеваниях печени, дефиците витамина К, механической желтухе, при избытке в крови антикоагулянтов.

Повышение ПИ наблюдается при передозировке витамина К, в поздние сроки беременности и других состояниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С. Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – М.: «Ньюдиамед-АО», 2001. 296 с. WHO Expert Committee on Standardisation: WHO Technocal Report Series, No. 889; 1999.
1. Deykin, D, Anticoagulant therapy. In. Colman, R.W. Hirsh, J, Marder. V., Salzman, EW (Eds.); Haemostatis and Thrombosis, JB Lippincott, Philadelphia, 1982, p1000.
2. Errichette A.M. Holden A. Ansell J; Management of Oral Anticoagulant Therapy: experience with an Anticoagulation Clinic, Arch. Inter. Medicine 144; p 1966 (1984).
3. Hirsh J., Dalen J. E., Deykin D. Oral Anticoagulants: Mechanisms of Action, Clinical Effectiveness and Optmal Therapentic Range, 1992, Chest 102 (Suppl): 312S-326S.
4. Miale JB; Laboratory Medicine-Hematology, 4th edition, CV Mosbe, St Louis, (1972).