

Dade® Thrombin Reagent /

Реагенты in vitro для исследования гемостаза в наборах и отдельных упаковках: Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent)

THROMBIN REAGENT

Назначение

Для использования при количественном определении фибриногена в плазме и для ускорения свертывания антикоагулированных образцов в иммуногематологических исследованиях.

Резюме и разъяснение

Приобретенные и врожденные гипо- и афибриногенемии сопровождаются сниженным уровнем фибриногена.

Приобретенный дефицит фибриногена возникает, в частности, в результате внутрисосудистого протеолиза фибриногена под действием тромбина (коагулопатия потребления, например в акушерстве, вследствие оперативных вмешательств), змеиного яда или плазмина (первичный гиперфибринолиз, обусловленный терапией стрептокиназой, урокиназой или тканевым активатором плазминогена). Более того, умеренная гипофибриногенемия может возникать в случае сниженного синтеза (при острых или хронических заболеваниях печени), потерь во внутрисосудистом пространстве (например, при асците, остром кровотечении и ожоге) или повышенной деградации (при шоке или карциноме).

Обнаружено, что временное повышение уровня фибриногена возникает как следствие того, что он играет роль «острофазного белка».

- a. Появление проходящей гиперфибриногенемии возможно после оперативных вмешательств, травм, инфаркта миокарда и инфекций¹.
- b. Стойкая гиперфибриногенемия может возникать у пациентов с новообразованиями и хроническими воспалительными заболеваниями.

Известно, что с возрастом уровень фибриногена незначительно увеличивается.

Повышенное содержание фибриногена – это фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний².

Образцы крови, собранные у пациентов, получавших гепарин, могут не свернуться, поэтому перед лабораторным использованием единицы плазмы, возможно, потребуется перевести в сыворотку. Тромбин можно использовать для ускорения свертывания антикоагулированных образцов и единиц плазмы для иммуногематологических исследований³.

Принцип метода

Фермент тромбин превращает растворимый плазменный белок фибриноген в нерастворимый полимер фибрин. Время свертывания разведенной плазмы обратно пропорционально концентрации фибриногена в плазме⁴⁻⁶. Используя этот принцип,

Клаусс⁴ разработал простую процедуру определения фибриногена путем измерения времени свертывания разведенной плазмы после добавления тромбина. Полученное таким образом время свертывания затем сопоставляют с временем свертывания стандартизованного препарата фибриногена.

Реагенты

Примечание: Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent) можно использовать как вручную, так и в автоматических анализаторах гемостаза. Siemens Healthcare Diagnostics предоставляет справочные руководства (краткие инструкции) для ряда анализаторов гемостаза. Справочные руководства (краткие инструкции) содержат информацию по работе с анализатором и проведению анализа, которая может отличаться от информации, приведенной в настоящей инструкции по применению. В подобном случае информация, приведенная в справочных руководствах (кратких инструкциях), имеет приоритет перед настоящей инструкцией по применению. Также ознакомьтесь с инструкцией по эксплуатации, предоставленной производителем анализатора.

Поставляемые материалы

THROMBIN REAGENT, **REF** B4233-25

10 x → 1 мл, **THROMBIN REAGENT**, Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent)

THROMBIN REAGENT, **REF** B4233-27

10 x → 5 мл, **THROMBIN REAGENT**, Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent)

Состав

Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent): препарат лиофилизированного бычьего тромбина (ок. 100 МЕ/мл) со стабилизаторами и буферами.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики *in vitro*.

Подготовка реагентов

Растворите **THROMBIN REAGENT** в дистиллированной или деионизированной воде объемом, указанном на этикетке флакона. Закройте флакон и оставьте до растворения содержимого. Для перемешивания аккуратно поворачивайте содержимое. Не встряхивать. Вновь тщательно перемешайте перед использованием.

Примечание: Не используйте воду с консервантами.

Всегда храните **THROMBIN REAGENT** в исходном флаконе.

Признак непригодности реагента для использования: невоспроизводимые значения.

Хранение и стабильность

Если **THROMBIN REAGENT** хранится нераспечатанным при температуре от 2 до 8 °C, он может использоваться до истечения срока годности, указанного на этикетке.

Стабильность после	5 дн. при температуре от 2 до 8 °C (закрытый флакон)
восстановления:	8 ч. при температуре от 15 до 25 °C (закрытый флакон)

Информация по стабильности после загрузки в инструмент указана в справочных руководствах (кратких инструкциях) по каждому анализатору гемостаза.

Дополнительные необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

Раствор цитрата натрия для сбора крови при коагуляционных пробах
Стандартная человеческая плазма (Standard Human Plasma), **REF** ORKL
"Вероналовый Буфер Оурена Дейд" (Dade Owren's Veronal Buffer), **REF** B4234
Контрольная плазма, Норма, **REF** ORKE или

Си-Трол, контрольная плазма 1 (Dade® Ci-Trol® Level 1), [REF] B4244-10
 Контрольная плазма, Патология, [REF] OUPZ или
 Дейд Контроль аномального фибриногена Data-Fi (Dade® Data-Fi®), [REF] B4233-22
 Анализатор гемостаза

Образцы

Для получения плазмы осторожно смешайте одну часть раствора цитрата натрия (0,11 моль/л) с девятью частями венозной крови, не допуская образования пены. Немедленно отцентрифугируйте в течение не менее 15 мин. при ускорении от 1 500 до 2 500 x g и удалите надосадочную плазму.

Если анализ должен проводиться немедленно, плазму можно оставить на осажденных эритроцитах или отделить. Для отделения плазмы ее необходимо отобрать пластиковой пипеткой в пластиковую пробирку и хранить при температуре от 2 до 8 °C. Не хранить на льду.

Хотя по данным исследований⁸ хранение образцов плазмы при температуре 4 °C в течение до 72 ч. не приводит к значимому изменению уровня фибриногена, рекомендуется анализировать образцы как можно раньше после их взятия.

Для получения подробной информации о подготовке и хранении образцов см. документ CLSI H21-A5⁷.

Методика анализа

Определение уровня фибриногена

Вручную:

Разведите плазму пациента и контрольную плазму разбавителем образцов "Вероналовый Буфер Оурена Дейд" (Dade Owren's Veronal Buffer) в соотношении 1:10.

Отмерьте пипеткой в предварительно нагретые пробирки для коагулологии следующие объемы:		
	Плазма пациента	Контрольная плазма
Образец плазмы (разведенный 1:10) Контрольная плазма (разведенная 1:10)	0,2 мл –	– 0,2 мл
Инкубируйте на водяной бане при температуре 37 °C в течение 1–2 мин. или в термоблоке при температуре 37 °C в течение 2–4 мин. (не дольше 5 мин.)		
Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent) (хранящийся при температуре от 15–25 °C)	0,1 мл	0,1 мл
Запустите секундомер одновременно с добавлением Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent).		

Всегда исследуйте образцы и контроли в двух параллельных измерениях.

Расчет стандартной кривой

Приготовьте пять разведений Стандартная человеческая плазма (Standard Human Plasma) с помощью разбавителем образцов "Вероналовый Буфер Оурена Дейд" (Dade Owren's Veronal Buffer) в соотношении от 1:4 до 1:32. Тщательно перемешайте содержимое каждой пробирки, используя чистую пипетку для каждой пробирки.

Пример:

Пробирка	Вероналовый буфер Оурена Dade®	Стандартная человеческая плазма (Standard Human Plasma)	Перенести из пробир- ки 1	Разведение	Коэффициент преобразования*
1	1,5 мл	0,5 мл	-	1:4	x 2,5
2	0,4 мл	-	0,6 мл	1:6,67	x 1,5
3	0,6 мл	-	0,4 мл	1:10	x 1
4	0,3 мл	-	0,1 мл	1:16	x 0,625
5	0,7 мл	-	0,1 мл	1:32	x 0,312

* Соответствующее содержание фибриногена в каждом стандартном разведении относительно разведения 1:10 определяется путем умножения указанной концентрации эталона плазмы Standard Human Plasma на подходящий коэффициент преобразования.

Эти разведения используются для построения стандартной кривой в отличие от разведений 1:10, используемых для исследования образца пациента и контрольного образца. Нанесите среднее время свертывания каждой из 5 точек на двойную логарифмическую бумагу. Запишите концентрацию фибриногена на оси x, а время (с) на оси y. Стандартную линию получают путем соединения точек.

Построение новой стандартной кривой следует проводить при каждой замене оборудования или использовании новой серии Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent).

Внутренний контроль качества

Нормальный диапазон:	Контрольная плазма, Норма или Си-Трол, контрольная плазма 1 (Dade® Ci-Trol® Level 1)
Патологический диапазон:	Контрольная плазма, Патология или Дейд Контроль аномального фибриногена Data-Fi (Dade® Data-Fi®)

Необходимо измерять два контроля (один с нормальным диапазоном и один с патологическим диапазоном) как минимум каждые 8 ч. для анализов, запущенных для исследования образцов пациента в этот период. Контрольный материал следует обрабатывать после каждого построения новой калибровочной кривой и каждой замены флакона с реагентом. Если значения по контрольному материалу выпадают из заданного диапазона, может потребоваться повторная калибровка. Не создавайте отчет с результатами анализа пациента, пока причина отклонения значений не выяснена и не устранена.

Расчет результатов анализа (ручной метод)

Определите концентрацию фибриногена в плазме пациента (г/л) по калибровочной кривой и времени свертывания в разведениях плазмы 1:10.

1. Если получены слишком короткие временные интервалы (высокая концентрация фибриногена), разведите плазму в соотношении 1:20 (0,1 мл + 1,9 мл буфера) и повторите анализ. Затем умножьте значение (г/л), полученное по кривой, на коэффициент разведения (2).
2. Если получены слишком длинные временные интервалы (низкая концентрация фибриногена), разведите плазму только в соотношении 1:5 (0,2 мл + 0,8 мл буфера) или 1:2 (0,4 мл + 0,4 мл буфера) и повторите анализ. Затем разделите значение (г/л), полученное по кривой, на коэффициент разведения 5 или 2 соответственно.
3. Если плазма пациента в разведении 1:2 не свертывается, концентрация фибриногена составляет менее 0,15 г/л.

Свертывание гепаринизированных образцов пациента

К цельной крови или отделенной плазме добавьте сухой тромбин в количестве, обеспечивающем прилипание к кончикам нескольких ватных палочек, или добавьте 1 - 2 капли (0,1 мл) восстановленного Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent) (100 ед./мл) на 1 мл образца. Перемешайте и инкубируйте при температуре 37 °С в течение 5 до 10 мин.

Свертывание единиц плазмы

Добавьте от 1 до 2 мл восстановленного тромбинового реагента Dade® (100 ед./мл) к 250 мл плазмы. Перемешайте и инкубируйте при температуре 37 °С в течение от 30 мин. до 1 ч.

Примечание: Свертывание можно дополнительно ускорить, восстановив Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent) в 1 М CaCl₂, а не в дистиллированной или деионизированной воде, как указано на этикетке.

Ограничения методики

Следующие вещества в указанных уровнях, по-видимому, не взаимодействуют с Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent) в анализаторе SYSMEX CA-1500.

Не более

Билирубин	6 мг/дл
Гемоглобин (свободный)	100 мг/дл
Триглицериды	284 мг/дл
Гепарин (низкомолекулярный)	0,4 Е/мл
Гепарин (нефракционированный)	0,6 Е/мл

Полученные результаты могут быть искажены наличием гепарина или продуктов деградации фибрино(гено)лиза в плазме пациента. Значительные количества каждого из этих веществ могут привести к получению ложных низких значений фибриногена при исследовании⁹.

Для оптимизации характеристик продукта и удовлетворения заявленных спецификаций компания Siemens провела валидацию этих реагентов в различных анализаторах. Выполненные пользователем модификации не поддерживаются компанией Siemens, поскольку они могут негативно сказаться на работе системы и результатах анализа. Внося изменения в инструкции или используя эти реагенты в других анализаторах, не упомянутых в кратких инструкциях Siemens или данной инструкции по применению, пользователь сам несет ответственность за их применимость.

В каждом случае результаты данного теста следует интерпретировать с учетом анамнеза пациента, клинической картины и других показателей.

Стандартные значения

1,8 до 3,5 г/л¹⁰

Стандартные значения в различных лабораториях варьируются, что зависит от используемого метода и исследуемой популяции. Поэтому в каждой лаборатории должны быть приняты собственные стандартные интервалы.

(Для получения дополнительной информации об установке стандартных интервалов см. документ CLSI C28-A3¹¹.)

Отдельные рабочие характеристики

Данные, полученные по методу определения тромбинового времени, великолепно коррелировали с другими методами, часто используемыми для количественного анализа фибриногена^{8,12}.

Прецизионность и воспроизводимость

Проба с Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent) использовалась для измерения концентрации фибриногена в нормальном и патологическом контролях и объединенных образцах пациентов. С помощью анализатора SYSMEX CA-1500 выполняли по восемь измерений в день на протяжении 5 дн. (n = 40).

	Среднее значение (г/л)	CV в пределах одного анализа (%)	CV между различными анализами (%)	Общий CV (%)
Контрольная плазма, Норма	2,6	5,9	0,0	5,9
Контрольная плазма, Патология	0,89	4,8	0,0	4,8
Пулированная плазма с низким содержанием	0,95	7,1	2,3	7,4
Нормальная пулированная плазма	2,8	3,5	0,0	3,5
Дейд Контроль аномального фибриногена Data-Fi (Dade® Data-Fi®)	1,1	3,8	2,4	4,5

Сравнение методов

Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent) сравнивали с набором реагентов для определения фибриногена Dade® с помощью анализатора SYSMEX CA-1500, исследуя 80 образцов плазмы с концентрацией фибриногена от 0,50 до 8,6 г/л. Регрессионный анализ результатов позволил получить следующие уравнения:

Дейд Тромбин реагент (Dade Thrombin reagent)	(n =)	Наклон	Пересечение	Коэффициент корреляции
	80	1,03	-0,063 г/л	0,995

Библиография

1. Cooper J, Douglas AS. Fibrinogen level as a predictor of mortality in survivors of myocardial infarction. Fibrinolysis 1991; 5: 105-8.
2. Cook NS, Ubben D. Fibrinogen as a major risk factor in cardiovascular disease. Trends Pharmacol Sci. 1990; 11: 444-51.
3. Technical Manual of the American Association of Blood Banks 9th ed. Arlington: AABB; 1985: 417.
4. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. 1957; 17: 237-46.
5. Borgström S. On the prothrombin index in acute affections of the pancreas. Acta Chir Scand. 1945; 90: 419-30.
6. Jacobsson K. Studies on the determination of fibrinogen in human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest. 1955; 7 (Suppl 14): 1-54.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition. CLSI document H21-A5 (ISBN 1-56238-657-3). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne, PA 19087-1898 USA, 2008.
8. Morse EE, Panek S, Menga R. Automated fibrinogen determination. Amer J Clin Pathol. 1971; 55: 671-6.
9. CLSI. Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; Approved Guideline. 2nd Edition. CLSI Publication H30-A2. Villanova, PA. 2001.

10. Wagner C, Dati F. Fibrinogen. In: Thomas L, ed. Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt/Main, Germany: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH 1998: 609-12.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory*; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document C28-A3 (ISBN 1-56238-682-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2008.
12. Okuno T, Selenko V. Plasma fibrinogen determination by automated thrombin time. *Amer J Med Tech.* 1972; 38: 196-201.

Определение символов

	Не использовать повторно		Срок годности
	Номер партии		Каталожный номер
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Производитель
	Уполномоченный представитель в Европе		Содержит достаточное количество реагентов для анализов
	Биологическая опасность		Медицинское устройство для диагностики <i>In Vitro</i>
	Температурные ограничения		См. инструкцию по пользованию
	Нестерильно		Символ CE
	Содержание		Объем восстановленного раствора
	Уровень		Беречь от солнечных лучей

Ci-Trol, Dade и Data-Fi являются товарными знаками компании Siemens Healthcare Diagnostics.

SYSMEX является товарным знаком компании SYSMEX CORPORATION.

© 2008 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH.

Все права защищены.



Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany

Siemens Healthcare Headquarters

Siemens Healthcare GmbH
Henkestraße 127
91052 Erlangen/Германия
Phone: +49 9131 84-0
siemens.com/healthcare