

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест) по ТУ 9398-018-05595541-2008»

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест) по ТУ 9398-018-05595541-2008» (сокращенное наименование – ВА-тест) предназначен для выявления ВА в плазме крови пациентов коагулологическими методами.

Область применения. Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

Предназначенный пользователь. Определение наличия ВА в плазме крови пациентов с помощью набора ВА-тест может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль. В патогенезе антифосфолипидного синдрома ведущую роль играет наличие волчаночного антикоагулянта (ВА), группы сходных ингибиторов свертывания крови, принадлежащих к иммуноглобулинам класса IgG и IgM. Их присутствие приводит к развитию как артериальных, так и венозных тромбозов на фоне различных заболеваний: системной красной волчанки, ревматоидного артрита и т.п. Кроме того, волчаночный антикоагулянт ассоциируется с различными патологиями беременности, такими как невынашивание плода, синдром задержки развития плода, мертворождение.

Научная обоснованность теста. В основу метода определения ВА положено его свойство ингибировать фосфолипиды, удлиняя тем самым время свертывания в тестах АЧТВ, время разбавленного яда гадюки Рассела, протромбиновое время, каолиновое время и т.п. Подкомитет по Науке и Стандартизации Международного Общества Тромбоза и Гемостаза предложил следующие критерии для диагностики ВА:

- удлинение одного или более фосфолипид-зависимых скрининговых коагуляционных тестов;
- отсутствие коррекции удлинения теста при смешивании исследуемого образца с нормальной плазмой;
- коррекция удлинения теста при избытке фосфолипидов;
- отсутствие специфических ингибиторов любых факторов свертывающей системы крови.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

АЧТВс-реагент для скрининга, лиофильно высушенный – 4,0 мл/флакон – 2 флакона;
 АЧТВп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный – 2,0 мл/флакон – 2 флакона;
 ВАС-реагент для скрининга, лиофильно высушенный – 2,0 мл/флакон – 2 флакона;
 ВАп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный – 1,0 мл/флакон – 2 флакона;
 ПВс-реагент для скрининга, лиофильно высушенный – 1,0 мл/флакон – 1 флакон;
 ПВп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный – 4,0 мл/флакон – 1 флакон;
 Плазма контрольная, содержащая волчаночный антикоагулянт, лиофильно высушенная – 1,0 мл/флакон – 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор ВА-тест предназначен для определения наличия ВА в не менее чем 40 пробах плазмы пациентов.

Принцип метода

На первом этапе проводят тесты для обнаружения ВА, используя реагенты с низким содержанием фосфолипидов для усиления различия между нормальной и патологической плазмами (скрининговые тесты).

При удлинении времени свертывания выясняют, связано это с дисфункцией факторов свертывания или с присутствием ингибиторов. Для этого проводят тесты с добавлением в инкубационную среду нормальной плазмы, содержащей все факторы свертывания. Удлинение времени свертывания смеси нормальной и исследуемой плазмы свидетельствует о присутствии ингибиторов свертывания.

Для установления природы ингибиторов далее проводят тесты с реагентами, содержащими высокую концентрацию фосфолипидов или тромбоцитарных мембран для истощения антикоагулянтного эффекта ВА (подтверждающие тесты). Укорочение времени свертывания в этом случае будет свидетельствовать о наличии в исследуемой плазме ВА.

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАНЫХ КОНТРОЛЬНОМУ МАТЕРИАЛУ

Наличие волчаночного антикоагулянта в контрольной плазме устанавливали, сравнивая показатели свертывания с внутренним контрольным материалом, который в свою очередь был аттестован путем сравнения с 1-ой Международной референтной панелью, полученной из NBSRC, код 13/172.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения ВА: билирубин в концентрации не более 0,2 г/л, свободный гемоглобин – не более 2 г/л, триглицериды – не более 10 г/л. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно завышенных результатов.

Точность

Нормализованное отношение (НО) при исследовании Плазмы контрольной, содержащей ВА, равно или более 1,2. Значения НО в Плазме контрольной, содержащей ВА указано в паспорте медицинского изделия.

Значения времени свертывания, соответствующие нормальным

АЧТВс – 30-40 сек	АЧТВп – 25-35 сек
ПВс – 45-60 сек	ВАп – 14-18 сек
ВАС – 22-29 сек	ПВп – 20-26 сек

Ограничения метода

Клиническая диагностика не должна основываться только на результатах определения ВА набором ВА-тест. При постановке диагноза должны быть рассмотрены клинические симптомы и другая значимая тестовая информация.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов ВА-тест предназначен только для диагностики in vitro. Класс потенциально-опасного применения набора – 2а.

Набор реагентов ВА-тест не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с набором и образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: СанПин 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»; СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011 «Профилактика ВИЧ-инфекции».

⚠ Плазма контрольная, содержащая ВА получена из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее, не следует исключать остаточного минимального риска при работе с набором, поскольку плазма крови человека является потенциально опасным биологическим материалом.

При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека ВИЧ1 и ВИЧ2, вирусы гепатита В и гепатита С или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Полуавтоматический или автоматический коагулометр открытого типа с любой системой регистрации образования сгустка.
- термостат, поддерживающий температуру 37±1°C;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- 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);
- мерный цилиндр вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- кальций хлористый 0,025М раствор (5мл) (Код Р-9);
- физиологический, 0,9% раствор натрия хлористого;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор ВА-тест предназначен для определения наличия или отсутствия волчаночного антикоагулянта в плазме человеческой крови.

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

Процедура получения биологического материала

Для исследований необходимо использовать плазму крови, лишенную тромбоцитов, полученную двойным центрифугированием.

Венозную кровь взять в силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку на 3,8% (0,11 моль/л) цитрате натрия (9:1). Центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 2 мл бедной тромбоцитами плазмы.

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 часов при комнатной температуре и не более 8 часов при 2 - 8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20°C.

Ограничения по использованию биологического материала

Тромбоциты или тромбоцитарные фрагменты в исследуемой плазме влияют на результаты анализа, маскируя нарушения коагуляционных тестов, вызванные присутствием волчаночного антикоагулянта. Исследование гепаринизированной плазмы не рекомендуется.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Скрининговые тесты.

АЧТВс-реагент - внести во флакон 4 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

ПВс-реагент - внести во флакон 1 мл дистиллированной воды. Растворить при покачивании. Хранить при температуре 2 - 8°C не более 7 дней. Развести тромбопластин в 10 раз физиологическим раствором (0,1 мл тромбопластина + 0,9 мл физ. раствора) - А.

50 мкл А смешивают с 2 мл физиологического раствора и 2 мл кальция хлорида 0.025M - ПВс-реагент. Прогреть 10 мин при 37°C.

Использовать для анализа в течение 2 часов.

ВАС-реагент - внести во флакон 2 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

Подтверждающие тесты.

АЧТВп-реагент - внести во флакон с АЧТВ-реагентом 2 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

ПВп-реагент внести во флакон 4 мл дистиллированной воды и растворить при покачивании. Перед проведением анализа прогреть при 37°C в течении 30 мин.

ВАп-реагент внести во флакон 1 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

Плазма контрольная, содержащая ВА. Внести во флакон с плазмой контрольной 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании (избегать образования пены). Перед использованием раствор плазмы нужно выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение скрининговых и подтверждающих тестов.

Тесты АЧТВс, АЧТВп.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (нормальная)	50мкл
АЧТВс-реагент или АЧТВп-реагент	50мкл
Инкубировать при 37°C точно 3 минуты.	
Кальция хлорида 0,025 М раствор	50 мкл

Тест ПВс, ПВп.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (нормальная)	50мкл
Инкубировать при 37°C точно 2 минуты.	
ПВс-реагент или ПВп-реагент	100мкл

Тест ВАС, ВАп.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (нормальная)	50мкл
ВАС-реагент или ВАп-реагент	50мкл
Инкубировать при 37°C точно 1 минуту.	
Кальция хлорида 0,025 М раствор	50 мкл

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить времена свертывания со скрининговыми и подтверждающими реагентами от момента добавления кальция хлористого до момента образования фибринового сгустка.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.

Скрининговые тесты.

Результаты скрининговых тестов (АЧТВс, ПВс, ВАс) необходимо выразить в виде скринингового отношения (СО):

$$CO = \frac{T_b}{T_n}, \text{ где } T_b - \text{ время свертывания плазмы больного в скрининговом тесте.}$$

T_n – время свертывания нормального пула бедной тромбоцитами донорской плазмы или коммерческой нормальной донорской плазмы в скрининговом тесте.

Удлинение скринингового теста свидетельствует либо о дефиците факторов, либо о присутствии ингибиторов свертывания (в т.ч. и волчаночного антикоагулянта).

При $CO < 1,2$ волчаночный антикоагулянт отсутствует.

При $CO \geq 1,2$ необходимо провести тесты со смешением плазм.

Тесты со смешением плазм.

Удлинение скринингового теста свидетельствует либо о дисфункции одного или нескольких факторов свертывания, либо о присутствии в плазме больного ингибитора свертывания. Для дифференциальной диагностики в этом случае применяют метод смешения исследуемой плазмы с пулом нормальной бедной тромбоцитами донорской плазмы.

Для этого необходимо смешать нормальную донорскую плазму с исследуемой плазмой (или контрольным материалом) в соотношении 1:1 (например, 0,4мл нормальной донорской плазмы смешать с 0,4мл исследуемой плазмы больного, или контрольного материала). Данную смесь прогреть при 37°C в течение 10 минут. Произвести измерения времени свертывания, используя АЧТВс, ПВс, ВАс. Рассчитать скрининговое отношение смеси плазм (СО_{сп}):

$$CO_{sp} = \frac{T_{сп}}{T_n}, \text{ где } T_{сп} - \text{ время свертывания смеси исследуемой плазмы больного и нормальной донорской плазмы в скрининговом тесте.}$$

СО_{сп} < 1,2 свидетельствует о патологии факторов свертывания в исследуемой плазме.

СО_{сп} > 1,2 свидетельствует о наличии в исследуемой плазме ингибиторов свертывания, как специфических (факторов свертывания), так и неспецифических (волчаночного антикоагулянта)

Для дифференцирования ВА и специфических ингибиторов факторов свертывания, например, VIII фактора необходимо провести подтверждающие тесты.

Подтверждающие тесты.

Результаты подтверждающих тестов (АЧТВп, ПВп, ВАп) необходимо выразить в виде подтверждающего отношения (ПО):

$$PO = \frac{T_b}{T_n}, \text{ где } T_b - \text{ время свертывания плазмы больного в подтверждающем тесте;}$$

T_n – время свертывания нормального пула бедной тромбоцитами донорской плазмы в подтверждающем тесте (каждая лаборатория в соответствии с требованиями Комитета по Стандартизации устанавливает самостоятельно), или коммерческой нормальной донорской плазмы.

Вычисление Нормализованного Отношения.

Окончательное решение о наличии в плазме больного ВА делают после вычисления Нормализованного Отношения (НО)

$$\text{по формуле: } NO = \frac{CO}{PO}$$

Нормальное значение Нормализованного Отношения составляет 0,8 – 1,2

При $NO < 1,2$ – волчаночный антикоагулянт отсутствует;

$NO > 1,2$ – волчаночный антикоагулянт положительный;

При $NO > 1,2$ даже в одном тесте исследуемый образец следует считать положительным по волчаночному антикоагулянту.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль правильности выявления волчаночного антикоагулянта следует осуществлять с помощью плазмы контрольной, содержащей волчаночный антикоагулянт.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается хранение при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание наборов допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность рабочих растворов реагентов.

Реагенты	+2-8°C	+18-22°C	-18-20°C
АЧТВс-реагент	14 суток	2 суток	2 месяца
АЧТВп-реагент	14 суток	2 суток	2 месяца
ПВс-реагент	2 часа	-	-
ПВп-реагент	7 суток	2 суток	3 месяца
ВАс-реагент	2 суток	8 часа	-
ВАп-реагент	2 суток	8 часа	2 месяца
Плазма контрольная	8 часов	4 часа	2 месяца

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

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов ВА-тест требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» отходы от работы с набором ВА-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на три четверти, 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.

Наборы реагентов ВА-тест, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г»). Диагностические средства собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного) в соответствии с требованиями нормативных документов в зависимости от класса опасности отходов. Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

ЛИТЕРАТУРА

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., «НьюДиамед», 2001. - 285 с.
- Берковский А.Л., Калашникова Л.А., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Качалова Н.Д., Васильев С.А., Орел Е.Б., Козлов А.А. Диагностика волчаночного антикоагулянта. М., 2017. - 48 с.
- Зубанов Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000. - 360 с.

ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

- ГОСТ Р 51088-2013. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
- ГОСТ ISO 17511-2011 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, присписанных калибраторам и контрольным материалам.
- ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
- ГОСТ Р ЕН 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.
- ГОСТ Р ЕН 13641-2010 Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro.
- ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
- ГОСТ Р ИСО18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация. Предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
- Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г №11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Номер по каталогу
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Биологический риск
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

Дата утверждения инструкции 9 сентября 2008 г.

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

Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.

