



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для исследования агрегационной активности тромбоцитов (АГРЕНАМ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор АГРЕНАМ, состоящий из индукторов агрегации аденозин 5'-дифосфата, коллагена и ристоцетина, предназначен для исследования агрегационной активности тромбоцитов.

Аденозин 5'-дифосфат (АДФ) используют как индуктор при рутинном анализе агрегации тромбоцитов для определения их дисфункции или активации.

АДФ локализуется в плотных гранулах тромбоцитов, с помощью АДФ тромбоцит активирует сам себя, тем самым способствуя изменению формы, дегрануляции и агрегации.

Коллаген используется для исследования агрегации тромбоцитов с целью диагностики тромбастении Гланцмана, синдрома Вискотта-Олдрича, дефектов рецепторов коллагена GrVI и GrIa/IIa, дефицита пулов хранения.

Ристоцетин (ристомицин) используется для исследования агрегации тромбоцитов с целью диагностики болезни Виллебранда.

1 флакон с лиофильно высушенным АДФ предназначен для проведения 30 анализов.

1 флакон с лиофильно высушенным коллагеном предназначен для проведения 30 анализов.

1 флакон с лиофильно высушенным ристоцетином предназначен для проведения 15 анализов.

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТА

Принцип метода. In vivo тромбоциты участвуют в первичном гемостазе вначале прилипают, а затем агрегируют в месте повреждения сосуда. In vitro агрегация тромбоцитов может быть инициирована добавлением различных индукторов: АДФ, коллаген, ристоцетин, тромбин, адреналин, арахидоновая кислота, которые позволяют проводить дифференциальную диагностику тромбоцитопатий. Индукторы, добавленные к обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), вызывают адгезию тромбоцитов. При этом нормальные тромбоциты изменяют свою форму, высвобождают эндогенный АДФ и агрегируют. Исследование агрегации тромбоцитов проводят в оптическом или импедансном агрегометре. Оптические приборы регистрируют изменение пропускания света через кювету с ОТП в процессе агрегации тромбоцитов под действием индуктора агрегации, импедансные приборы регистрируют агрегацию в цельной крови по изменению электропроводности.

Состав набора реагента код АГ-6

АДФ, лиофильно высушенный с концентрацией 0,2 мМ/л – 2 флакона;

Коллаген, лиофильно высушенный с концентрацией 0,2% – 2 флакона;

Ристоцетин, лиофильно высушенный с концентрацией 1,5% – 2 флакона.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Растворимость АДФ и ристоцетина в воде при комнатной температуре (18-25°C) не более 30 сек, коллагена не более 30 мин.

В ОТП здоровых доноров агрегационная активность составляет с:

АДФ – 50-80%

коллагеном - 50-80%;

ристоцетином – 55-90%

Коэффициент вариации и межфлаконная вариация при исследовании агрегации тромбоцитов под действием индукторов не выше 15%.

Линейность. Агрегация тромбоцитов является не линейной тест-системой. Тест агрегации измеряет степень выражено

сти ответа (агрегационную активность) на индуктор, но не измеряет концентрацию реагирующих веществ.

Точность. Агрегация тромбоцитов является относительной величиной, зависящей от применяемой тест-системы.

Прецизионность и воспроизводимость теста. Прецизионность и воспроизводимость теста основаны на экспериментально установленном международном консенсусе и составляют $\pm 15\%$.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен только для диагностики in vitro. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

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

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

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Агрегометр любого типа;
- кюветы с мешалками к агрегометру
- 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;

перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В течение 7-10 дней до исследования пациенты не должны принимать аспирин и другие аспирин содержащие медикаменты. За 12 ч до сбора проб крови пациенты должны воздерживаться от пищи, особенно от жирной. Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) 5.5-водным цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) 2-водным цитратом натрия.

Получение обогащенной тромбоцитам плазмы. ОТП получить центрифугированием при комнатной температуре (18-25°C) в течение 10 мин при 1000 об/мин (150 г). Для анализов достаточно 1,0 мл ОТП. Количество тромбоцитов в ОТП не должно превышать 250 ± 50 тыс/мм³.

Получение бедной тромбоцитам плазмы. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получить центрифугированием цитратной крови в течение 20 мин при комнатной температуре и при скорости вращения 4000 об/мин (2500 г).

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре (18-25°C).

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Приготовление и стабильность реагентов:

Лиофильно высушенные реагенты перед растворением выдерживать при комнатной температуре.

Приготовление рабочих растворов АДФ.

Внести во флакон с лиофильно высушенным АДФ 1,0 мл дистиллированной воды, растворить содержимое флакона при покачивании. Концентрация АДФ в растворе равна 0,2 мМ/л (2×10^{-4} моль/л).

Одноволновая агрегация, рабочая концентрация АДФ 2×10^{-4} моль/л. Конечная концентрация АДФ в ОТП 2×10^{-5} моль/л

Биволновая агрегация, рабочая концентрация АДФ 4×10^{-5} моль/л. Конечная концентрация АДФ в ОТП 4×10^{-6} моль/л

Развести исходный раствор АДФ в 2 раза физиологическим раствором (1 объем раствора АДФ + 1 объем физиологического раствора).

Биволновая агрегация, рабочая концентрация АДФ 2×10^{-5} моль/л. Конечная концентрация АДФ в ОТП 2×10^{-6} моль/л

Развести исходный раствор АДФ в 10 раз физиологическим раствором (0,10 мл раствора АДФ + 0,9 мл физиологического раствора).

Приготовление рабочих растворов коллагена.

Внести во флакон с лиофильно высушенным коллагеном 1,0 мл дистиллированной воды, дать регидратироваться содержимому флакона в течение 3-5 минут и тщательно перемешать пипетированием. Концентрация коллагена в растворе равна 2 мг/мл.

Для получения раствора коллагена с концентрацией 1 мг/мл к 1 объему исходного раствора добавить равный объем физиологического раствора NaCl.

Раствор реагента стабилен в течение 3 сут при хранении в плотно закупоренном исходном флаконе при температуре 2-8°C.

Приготовление рабочих растворов ристоцетина.

Внести во флакон с лиофильно высушенным ристоцетином 0,5 мл дистиллированной воды, растворить содержимое при покачивании. Полученный раствор содержит 1,5% (15 мг/мл) ристоцетина – рабочий раствор.

Проведение анализа

1. Для приготовления слепой пробы внести в кювету агрегометра 0,3 мл БТП.
2. Внести в другую кювету 0,3 мл ОТП и инкубировать эту кювету в течение 3 мин при температуре 37°C, затем внести в эту кювету мешалку.
3. При необходимости установить 0 и 100% в соответствии с инструкцией к агрегометру.
4. В центр кюветы с ОТП внести 0,03 мл раствора соответствующего индуктора агрегации.
5. В течение 5 - 15 мин наблюдать за процессом агрегации тромбоцитов.

Определение агрегации тромбоцитов от каждого пациента необходимо проводить 2-3 раза и рассчитывать среднее арифметическое значение полученного результата.

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Провести запись агрегатограммы исследуемой плазмы пациента. Сравнить полученные результаты с данными контрольных анализов от здорового донора и от пациента, принимающего аспирин.

По агрегатограмме определить лаг-фазу, % светопропускания при появлении первой волны агрегации и максимум светопропускания, %, за 5 - 10 мин агрегации.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

В нормальной плазме здоровых лиц уровень агрегационной активности тромбоцитов под действием АДФ составляет 50-80%;

Агрегация под действием АДФ отсутствует при тромбастении Гланцмана, снижена при синдроме Вискотта-Олдрича,

отсутствует вторая волна агрегации при дефиците пулов хранения. Аспирин в дозе 0,25 г/сутки полностью блокирует агрегацию-реакцию выброса (отсутствует вторая волна агрегации).

В нормальной плазме здоровых лиц уровень агрегационной активности тромбоцитов под действием коллагена составляет 50-80%;

Агрегация тромбоцитов под действием коллагена резко снижена или полностью отсутствует при тромбастении Гланцмана, синдроме Вискотта-Олдрича, дефектах рецепторов коллагена, дефиците пулов хранения, при нарушении метаболизма арахидоновой кислоты.

В нормальной плазме здоровых лиц уровень агрегационной активности тромбоцитов под действием ристоцетина составляет 55-90%;

Агрегация под действием ристоцетина отсутствует или снижена при синдроме Бернара-Сулье или болезни Виллебранда I или III типов. Агрегация в 1,5-2 раза выше нормы может наблюдаться при синдроме Виллебранда тромбоцитарного типа

ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

Пробы крови пациентов не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, быть хилёзными, от пациентов с желтухой и липемией, содержать менее 75 тыс/мм³ тромбоцитов и не должны иметь пониженное количество фибриногена.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контрольный материал для ежедневного контроля нормы должен состоять из свежесобранной обогащенной тромбоцитами плазмы, полученной от кадрового донора, который имеет нормальную функцию тромбоцитов и не принимал аспирин и нестероидные противовоспалительные препараты в течение 10 дней до анализа.

Контрольный материал для контроля патологии должен состоять из свежесобранной обогащенной тромбоцитами плазмы, полученной от пациента, регулярно принимающего аспирин в дозе 100 мг/сутки.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Лиофильно высушенные индукторы агрегации стабильны в течение всего срока годности реагентов при условии хранения в закупоренном виде при температуре 2-8°C. Растворы реагентов можно хранить в плотно закупоренном состоянии при температуре 2-8°C не более 3 сут., в замороженном состоянии при температуре - 18-24°C не более 2 мес.

Срок годности реагента – 24 мес.

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

