



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест) предназначен для коагулологического определения наличия ВА в плазме крови пациентов по критериям Подкомитета по Науке и Стандартизации Международного Общества по Тромбозам и Гемостазу.

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.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав:

АЧТВс, лиофильно высушенный скрининговый реагент на основе фосфолипидов и активатора – эллаговой кислоты (4мл) – 2 флакона;
 АЧТВп, лиофильно высушенный подтверждающий реагент на основе избытка фосфолипидов и активатора – эллаговой кислоты (2мл) – 2 флакона;
 ПВс лиофильно высушенный скрининговый реагент на основе экстракта мозга кролика в буфере со стабилизаторами (1мл) – 1 флакон;
 ПВп, лиофильно высушенный подтверждающий тромбопластин-кальциевый реагент из мозга кролика в буфере со стабилизаторами (4мл) - 1 флакон;
 ВAc лиофильно высушенный скрининговый реагент на основе смеси яда гадюки Рассела и фосфолипидов (2мл) – 2 флакона;
 ВАп лиофильно высушенный подтверждающий реагент на основе смеси яда гадюки Рассела и избытка фосфолипидов (1мл) – 2 флакона;
 Плазма контрольная, содержащая ВА – 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор ВА-тест предназначен для определения наличия ВА в не менее чем 20 пробах плазмы пациента.

Принцип метода.

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 по Тромбозам и Гемостазу предложил следующие критерии для диагностики ВА:

удлинение одного или более фосфолипид-зависимых тестов, отсутствие коррекции удлинения теста при добавлении равного объема нормальной плазмы, и отсутствие специфических ингибиторов любых факторов свертывающей системы крови.

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.

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;
- реагент для приготовления стабилизатора крови (Цитрат натрия) или вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- вода дистиллированная;
- физиологический, 0,9% раствор натрия хлористого;
- кальций хлористый 0,025М раствор (5мл)
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

Код Р-9;

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, примесь 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% (0,11моль/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 0,025М - ПВс-реагент. Прогреть 10 мин при 37°C. Использовать для анализа в течение 2 часов.

ВAc-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.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

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
Закрепить время свертывания в секундах на коагулологическом анализаторе.*	

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
Зафиксировать время свертывания в секундах на коагулологическом анализаторе.*	

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
Зафиксировать время свертывания в секундах на коагулологическом анализаторе.*	

*Для всех типов коагулологических анализаторов.

Значения, соответствующие нормальным

АЧТВс – 30-40 сек	АЧТВп – 25-35 сек
ПВс – 45-60 сек	ПВп – 12-18 сек
ВAc – 22-29 сек	ВАп – 20-26 сек

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.

Скрининговые тесты.

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

$$CO = \frac{T_6}{T_n}$$

где T_6 – время свертывания плазмы больного в скрининговом тесте. T_n – время свертывания нормальной 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, ВAc. Рассчитать скрининговое отношение смеси плазм (СОсп):

$$CO_{cn} = \frac{T_{cn}}{T_n}$$

где T_{cn} – время свертывания смеси исследуемой плазмы больного и нормальной донорской плазмы в скрининговом тесте.

$CO_{cn} < 1,2$ свидетельствует о патологии факторов свертывания в исследуемой плазме.

$CO_{cn} > 1,2$ 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):

$$PO = \frac{T_6}{T_n}$$

где T_6 – время свертывания плазмы больного в подтверждающем тесте; T_n – время свертывания нормальной 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)

$$HO = \frac{CO}{PO}$$

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

При $HO < 1,2$ – волчаночный антикоагулянт отсутствует;

$HO > 1,2$ – волчаночный антикоагулянт положительный;

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

При $HO > 1,2$ 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. 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 виде

Стабильность рабочих растворов реагентов.

Реагенты	+2-8°C	+18-22°C	-18-20°C
АЧТВс-реагент	14 дней	2 дня	2 мес.
АЧТВп-реагент	14 дней	2 дня	2 мес.
ПВс-реагент	2 часа	-	-
ПВп-реагент	2 дня	7 дней	3 мес.
ВAc-реагент	2 дня	8 часа	-
ВАп-реагент	2 дня	8 часа	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 допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие реагента Ренампластин требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

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 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 специальной 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.

Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.

