



**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;
- ВAp 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)
- Код Р-9;
- 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, 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.

**ВAp-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
Зафиксировать время свертывания в секундах на коагулологическом анализаторе.*	

### Тест ПВс, ПВп.

<b>Внести в кювету анализатора:</b>	<b>Объем</b>
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.

<b>Внести в кювету анализатора:</b>	<b>Объем</b>
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

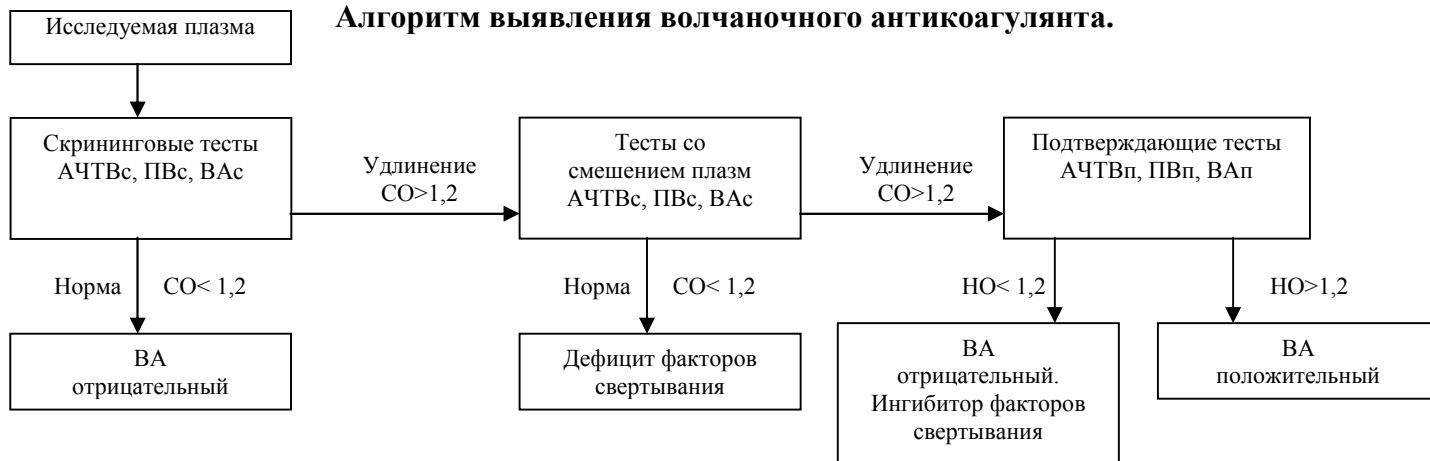
В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с Ренампластином с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

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 специального 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](mailto:info@renam.ru).

### Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.



Уважаемые коллеги,

Мы увеличили объем АЧТВс реагента, используемого для скрининга.

Просим обратить на это внимание, прочитайте внимательно инструкцию.

Спасибо!