

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для выполнения коагуляционных тестов (Коагуло-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Коагуло-тест предназначен для проведения тестов: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), частичное тромбопластиновое время (ЧТВ) (кефалиновое время), активированное время рекальцификации (АВР) (каолиновое время), используемых для выявления широкого диапазона коагуляционных нарушений и контроля за эффективностью проводимого лечения прямыми антикоагулянтами.

Набор реагентов предназначен для работы на полуавтоматических и автоматических коагулометрах, способных регистрировать образование сгустка в присутствии каолина.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

Эририд (кефалин), лиофильно высушенный (1,0 мл) – 2 флакона;

Каолин 0,5% суспензия (5,0 мл) – 2 флакона;

Кальций хлористый 0,025 М раствор (5,0 мл) - 2 флакона.

Число анализируемых проб биологического материала

Один набор предназначен для проведения 200 анализов плазмы крови при расходе по 50 мкл реагентов на один анализ или 100 анализов плазмы крови при расходе по 100 мкл реагентов на один анализ.

Принцип метода

АЧТВ. Инкубирование плазмы с оптимальным стандартизованным соотношением фосфолипидов и каолина активирует факторы внутреннего пути свертывания. Добавление в систему ионов кальция купирует цитрат плазмы и позволяет получить фибриновый сгусток. В процессе измерения АЧТВ регистрируют время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка.

АВР. Добавление к исследуемой плазме веществ, обладающих способностью к контактной активации фактора Хагемана, таких как суспензия каолина, стандартизирует начальную фазу процесса свертывания крови и значительно ускоряет этот процесс. При этом дальнейшая активация факторов коагуляционного каскада происходит на собственных (присутствующих в исследуемой плазме) фосфолипидных матрицах.

ЧТВ. Принцип основан на определении времени свертывания плазмы при добавлении к ней оптимального количества фосфолипидов и кальция хлористого.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на правильность определения АЧТВ, АВР и ЧТВ: билирубин в концентрации до 0,2 г/л; гемоглобин (свободный) – до 1 г/л; триглицериды – до 1,2 г/л. Уменьшение активности факторов внутреннего пути свертывания ниже 50% приводит к увеличению АЧТВ и АВР до патологических значений.

Результаты определения АЧТВ и АВР могут зависеть от назначаемых препаратов. Эстрогены у мужчин и оральные контрацептивы у женщин снижают значения АЧТВ и АВР. Препараты дифенина, гепарина, варфарина, гирудина и других прямых ингибиторов тромбина могут повышать АЧТВ и АВР.

На результаты определения АЧТВ влияет выбор антикоагулянта и соблюдение точного соотношения антикоагулянт:кровь.

Тест чувствителен к присутствию в крови дефицита факторов внутреннего пути свертывания, прямых и непрямых антикоагулянтов, волчаночного антикоагулянта.

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения АЧТВ, ЧТВ и АВР в одной пробе плазмы одним набором не превышает 10%. Коэффициент вариации результатов определения АЧТВ, ЧТВ и АВР в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Нормальный диапазон значений АЧТВ, АВР и ЧТВ указаны в паспорте на конкретную серию реагентов.

Значения, соответствующие нормальным*

АЧТВ, сек	35 – 45
АВР, каолиновое время, сек	70 – 90
ЧТВ, кефалиновое время, сек	55 – 75

*Точные значения указываются в паспорте на набор.

Удлинение теста указывает на:

- гипокоагуляцию;
- гемофилию А, В, или врожденную недостаточность фактора XI;
- дефицит факторов II, V, VIII, IX, XI, XII или фибриногена;
- болезнь фон Виллебранда;
- II и III фазы ДВС-синдрома;
- наличие ингибиторов свертывания (специфических или неспецифических);
- дефицит витамина К;
- тяжелая патология печени;
- лечение непрямыми антикоагулянтами;
- лечение прямыми антикоагулянтами.

Укорочение теста указывает на гиперкоагуляцию, склонность к тромбообразованию, на первую фазу ДВС-синдрома. Укорочение теста может быть связано с ошибками, допущенными при взятии крови и получении плазмы на стадии преаналитического этапа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro*. Класс опасности 2а.

При работе с набором следует соблюдать «Инструкцию по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (утверждена Министерством здравоохранения СССР 17.01.1991 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, вирусы гепатита В и С 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 раствор (0,9% раствор натрия хлорида);
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Набор реагентов АЧТВ-тест предназначен для определения АЧТВ 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

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, центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Условия хранения биологического материала

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2-8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранение при этой температуре не более 2 мес. Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

Ограничения по использованию биологического материала

При скрининге пациентов на присутствие неспецифических ингибиторов свертывания (волчаночный антикоагулянт) тромбоциты или тромбоцитарные фрагменты в исследуемой плазме влияют на результаты анализа, маскируя нарушения коагуляционных тестов, вызванные присутствием волчаночного антикоагулянта. Для исследований необходимо использовать плазму крови, лишенную тромбоцитов, полученную двойным центрифугированием.

После первого центрифугирования плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин. Немедленно после центрифугирования перенести верхний слой плазмы (не более половины объема) в пластиковую пробирку. Остаточное содержание тромбоцитов в плазме не должно превышать 1000/μл плазмы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для теста АЧТВ

Кефалин-каолиновая смесь. Внести во флакон с эрилидом (кефалином) 5,0 мл суспензии каолина. Растворить при покачивании. Кефалин-каолиновая смесь готова к проведению анализа через 30 минут после добавления каолина. Перед проведением анализа встряхивать.

Для теста АВР (каолиновое время)

Каолин. Суспензия легкой фракции каолина в физиологическом растворе. Является готовым реагентом для проведения анализа. Вскрытый флакон можно использовать повторно при условии хранения при 2-8°C в плотно закрытом состоянии.

Для теста ЧТВ (кефалиновое время)

Кефалиновый реагент. Внести во флакон с эрилидом (кефалином) 5,0 мл физиологического раствора. Растворить при покачивании. Кефалиновый реагент готов к проведению анализа через 30 минут после добавления физиологического раствора.

Кальций хлористый 0,025 М раствор. Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть при 37°C. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения АЧТВ.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу измерения.
- Считать результаты.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом на термобане

Внести в кювету анализатора или в пробирку на термобане:	Объем, мкл
Плазму контрольную (исследуемую)	50
Кефалин-каолиновую смесь (или суспензию каолина, или кефалиновый реагент)	50
Инкубировать при температуре 37°C точно 3 мин.	
Кальций хлористый 0,025 М раствор	50

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе измерения АЧТВ, АВР и ЧТВ зарегистрировать время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

В случае удлинения АЧТВ следует провести тест со смешением плазмы пациента с нормальной донорской плазмой в соотношении 1:1. Если АЧТВ остается удлиненным, это означает, что образец содержит гепарин или антифосфолипидные антитела (волчаноч-

ный антикоагулянт) или специфические ингибиторы факторов свертывания. Если тест со смешением плазм показывает нормальные результаты, то вероятен дефицит факторов свертывания VIII, IX, XI или XII. Для выявления истинной причины удлинения теста АЧТВ следует проводить дополнительные исследования.

Тест АЧТВ применяют для одностадийного измерения активности факторов свертывания VIII, IX, XI и XII, используя соответствующие субстрат дефицитные плазмы, калибровочную плазму (Мультикалибратор) и контрольные плазмы в нормальной и патологической областях НПО «РЕНАМ».

Международные организации ISTH/ICSH рекомендуют тест АЧТВ в качестве надежного метода контроля антикоагулянтной терапии гепарином, так как для этого теста характерна почти линейная зависимость результатов от концентрации гепарина. В присутствии терапевтических доз гепарина АЧТВ удлинится приблизительно в 1,5 – 2,5 раза (точные значения диапазона удлинения каждая лаборатория должна устанавливать самостоятельно).

АЧТВ тест следует проводить одновременно с определением протромбинового и тромбинового времени.

Каолиновое время. Рекомендуется использовать для выявления пациентов с наличием волчаночного антикоагулянта.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические АЧТВ, ЧТВ и АВР следует контролировать с помощью Плазмы контрольной (пул здоровых доноров) Плазма Н производства НПО РЕНАМ, код КМ-1.

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 приготовленных реагентов

Реагенты	2-8°C	18-22°C	- 18-20°C
Кефалин-каолиновая смесь	14 сут	2 сут	2 мес.
Каолин	2 мес.	14 сут	-
Кефалиновый реагент	2 сут	8 ч	2 мес.
Кальций хлористый 0,025 М раствор	В укупоренном виде - 24 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 не допускается.

ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора Коагуло-тест 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 Набором Коагуло-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на $\frac{3}{4}$, 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, корп. 2. тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru.