

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
антикоагулянтов волчаночного типа

Экспресс-Люпус-тест

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Экспресс-Люпус-тест предназначен для скрининга антикоагулянтов волчаночного типа (ВА или люпус-антикоагулянта). В плазме крови ВА связываются с отрицательно заряженным фосфолипидом и белково-фосфолипидным комплексам и тормозят активацию и взаимодействие между собой плазменных факторов свертывания крови. Наиболее четко эти нарушения выявляются в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах.

Наличие в плазме ВА сопровождается рецидивирующими тромбозами вен и артерий, нарушениями мозгового кровообращения (головные боли, обмороки, динамические расстройства мозгового кровообращения, парезы, эпизиндром, нарушения зрения и др.), фетоплацентарной недостаточностью, привычным невынашиванием беременности (выкидыши, внутриутробная гибель плода), тромбоцитопенией, реже - кровоточивостью микроциркуляторного типа, полиаллергией, другими иммунными нарушениями, склонностью к развитию ДВС-синдрома.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Определение ВА в оригинальном скрининговом варианте¹ основано на сравнительной оценке результатов в плазме больного активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) с двумя реагентами: высокочувствительным к ВА (АПТВ_{ВА+}) и низкочувствительным к ВА (АПТВ_{ВА-}).

Наличие в плазме ВА ведет к сравнительно большему удлинению времени свертывания в тесте с АПТВ_{ВА+}, чем с АПТВ_{ВА-}-реагентом.

Это различие не выявляется при других причинах удлинения свертывания, в частности, при дефиците факторов свертывания, наличии их ингибиторов, при лечении гепарином (до концентрации гепарина 0,25 ед/мл плазмы) и непрямых антикоагулянтами. При всех этих ситуациях имеется сходная гипокоагуляция в АПТВ_{ВА+} и АПТВ_{ВА-}-тестах.

Состав набора.

1. АПТВ-реагент с высокой чувствительностью к ВА (АПТВ_{ВА+}-реагент), 5 мл - 1 фл. Поставляется в жидкой форме, готовой к использованию.
2. АПТВ_{ВА-}-реагент с низкой чувствительностью к ВА (лиофилизированный), на 2,5 мл - 2 фл.
3. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М) - 2,0 мл - 1 фл.
4. Контрольная плазма, положительная на ВА - 1 фл.

Примечание: Для проведения исследований необходима также свежеполученная цитратная бедная тромбоцитами плазма здорового человека или РНП-плазма фирмы "Технология-Стандарт".

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Коэффициент вариации результатов определения АПТВ не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения АПТВ в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения *in vitro*.

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- коагулометр;
- при отсутствии коагулометра - секундомер, термобаня на +37°C;
- пипетки вместимостью 0,1 -1,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% раствор натрия лимоннокислое 3-х замещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

Внимание! Для получения воспроизводимых и точных результатов особое внимание должно уделяться соблюдению режима центрифугирования.

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы больных, содержащей гепарин, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1.1. АПТВ_{ВА+}-реагент.

АПТВ_{ВА+}-реагент входит в состав набора разведенным и готовым к использованию. Рекомендуется отливать необходимое на день работы количество реагента в отдельную пробирку, основной же флакон необходимо постоянно хранить при температуре +2...+8°C в течение всего срока использования набора, не замораживать. Расход АПТВ_{ВА+}-реагента на один образец плазмы крови - 0,1 мл.

1.2. Разведение АПТВ_{ВА-}-реагента.

В один из флаконов с АПТВ_{ВА-}-реагентом внести 2,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°C) и легком покачивании в течение 2 мин, после чего полученную суспензию дополнительно гомогенизировать пипетированием, избегая образования пены. В результате получают раствор АПТВ_{ВА-}-реагента, который до использования должен быть выдержан при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 15

мин. Разведенный АПТВ_{ВА-} -реагент можно использовать в течение 6 ч в условиях хранения при комнатной температуре и не более 7 дней - при температуре +2...+8°C. Расход АПТВ_{ВА-} -реагента на один образец плазмы крови - 0,1 мл.

1.3. Приготовление рабочего раствора хлорида кальция.

В день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор хлорида кальция из флакона развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды), получают рабочий (0,277%) раствор хлорида кальция (далее по тексту - раствор хлорида кальция). Данный раствор хлорида кальция можно хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 1 дня или в герметично закрытом флаконе не более 2 дней при температуре +2...+8°C. Расход рабочего раствора хлорида кальция на один образец плазмы крови - 0,2 мл.

1.4. Разведение контрольной плазмы, положительной на ВА.

Во флакон с контрольной плазмой, положительной на ВА, внести 0,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°C) и легком покачивании в течение 3 мин.

Контрольная плазма разводится в день начала использования реагентов набора "Экспресс-люпус-тест" и служит для проверки правильности выполнения анализа. Используется в течение 2 ч после разведения в условиях хранения при комнатной температуре.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Этап 1.

1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл плазмы больного.
2. Инкубировать при температуре +37°C 1 мин.
3. Добавить 0,1 мл разведенного АПТВ_{ВА+} -реагента, имеющего комнатную температуру.
4. Инкубировать при температуре +37°C 3 мин.
5. К смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора хлорида кальция (предварительно подогретого до +37°C) и зарегистрировать время свертывания.

Аналогично, с применением АПТВ_{ВА+} -реагента, определить время свертывания в контрольной нормальной плазме (или РНП-плазме).

Этап 2.

1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл плазмы больного.
2. Инкубировать при температуре +37°C 1 мин.
3. Добавить 0,1 мл разведенного АПТВ_{ВА-} -реагента, имеющего комнатную температуру.
4. Инкубировать при температуре +37°C 3 мин.
5. К смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора хлорида кальция (имеющего температуру +37°C) и зарегистрировать время свертывания

Аналогично, с использованием АПТВ_{ВА-} -реагента, определить время свертывания в контрольной нормальной плазме (или РНП-плазме).

3. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычисляют показатель NR по формулам:

$$R_1 = \frac{t_1}{t_2} \quad (1) \quad R_2 = \frac{t_3}{t_4} \quad (2) \quad NR = \frac{R_1}{R_2} \quad (3)$$

где: t_1 - время свертывания плазмы больного с реагентом АПТВ_{ВА+};

t_2 - время свертывания контрольной нормальной плазмы с реагентом АПТВ_{ВА+};

t_3 - время свертывания плазмы больного с реагентом АПТВ_{ВА-};

t_4 - время свертывания контрольной нормальной плазмы с реагентом АПТВ_{ВА-};

R_1 - показатель удлинения времени свертывания у больного, в сравнении с контролем, в тесте с АПТВ_{ВА+} -реагентом;

R_2 - показатель удлинения времени свертывания у больного, в сравнении с контролем, в тесте с АПТВ_{ВА-} -реагентом;

NR - отношение, которое количественно оценивает гипокоагуляционный эффект ВА.

У здоровых людей и больных с разными видами патологии гемостаза, но без наличия в плазме крови ВА, показатель NR в среднем равен 0,99 ($\sigma=0,10$), с пределами нормальных колебаний ($\pm 2\sigma$) от 0,79 до 1,19. Диапазон значений NR от 1,2 до 1,3 является сомнительным результатом и требует повторного обследования, а также сопоставления с другими тестами для выявления ВА. Если NR равен или превышает 1,3, определяют наличие волчаночного антикоагулянта.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на исследование 50 образцов плазмы крови.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности набора (18 мес.). Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Время использования набора не должно превышать 2 недель с момента вскрытия его компонентов.

Раствор АПТВ_{ВА+} -реагента можно хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 7 дней и в течение всего срока использования набора при температуре +2...+8°C. Замораживание не допускается.

Раствор АПТВ_{ВА-} -реагента можно хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 6 ч и не более 7 дней при температуре +2...+8°C. Замораживание не допускается.

Рабочий раствор хлорида кальция можно хранить при +37°C не более 6 ч, при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 1 дня или не более 2 дней в герметично закрытом флаконе при температуре +2...+8°C.

Контрольную плазму, положительную на ВА, можно хранить при комнатной температуре не более 2 ч. +2...+8°C