

**ИНСТРУКЦИЯ**

**по применению набора реагентов
для определения волчаночного
антикоагулянта**

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Экспресс-Люпус-тест предназначен для скрининга антикоагулянтов волчаночного типа (ВА или люпус-антикоагулянта). В плазме крови ВА связываются с отрицательно заряженным фосфолипидами и белково-фосфолипидными комплексами 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, эписиндром, 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 варианте [3] 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 непрямые антикоагулянтами. При всех этих ситуациях имеется сходная гипокоагуляция в АПТВ_{ВА+} и АПТВ_{ВА-}-тестах.

Состав набора:

1. АПТВ-реагент с низкой чувствительностью к ВА (АПТВ_{ВА-}-реагент) (лиофильно высушенный) - 2 фл.
2. АПТВ-реагент с высокой чувствительностью к ВА (АПТВ_{ВА+}-реагент), 5 мл - 1 фл.
3. Контрольная плазма, положительная на ВА (лиофильно высушенная) - 1 фл.
4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М), 2 мл - 1 фл.

Примечание: Для проведения исследований необходима также свежеполученная цитратная бедная тромбоцитами плазма здорового человека или РНП-плазма ООО фирмы "Технология-Стандарт" (кат. № 012).

**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**

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

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

Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.

Каталожный номер набора: 193

ООО фирма "Технология-Стандарт"

656037, Барнаул, а/я 1351, тел./факс (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39, 27-13-00

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.

Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

**ОБОРУДОВАНИЕ,
МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ**

- Центрифуга лабораторная;
- коагулометр (при отсутствии коагулометра - секундомер, термобаня на +37 °С);
- пипетки вместимостью 0,1 и 0,2-1,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ
АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконизированную пробирку, содержащую 3,8 % раствор натрия лимоннокислого трёхзамещенного (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 °С в течение всего срока использования набора.

Перед применением встряхнуть до получения однородной суспензии.

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 °С) 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 в течение 15 мин. Перед применением встряхнуть до получения однородной суспензии.

1.3. Приготовление рабочего раствора кальция хлорида

В день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор кальция хлорида из флакона развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды). Получают рабочий (0,277 %) раствор кальция хлорида (далее по тексту - раствор кальция хлорида).

1.4. Разведение контрольной плазмы, положительной на ВА

Во флакон с контрольной плазмой, положительной на ВА, внести **1,0 мл** дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре 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.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Этап 1. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл плазмы больного.

2. Инкубировать при температуре +37 °С в течение 1 мин.

3. Добавить 0,1 мл АПТВ_{ВА+} -реагента, имеющего комнатную температуру.

4. Инкубировать при температуре +37 °С в течение 3 мин.

5. К смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида (предварительно подогретого до +37 °С) и зарегистрировать время свертывания.

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

Этап 2. В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл плазмы больного.

2. Инкубировать при температуре +37 °С в течение 1 мин.

3. Добавить 0,1 мл разведенного АПТВ_{ВА-} -реагента, имеющего комнатную температуру.

4. Инкубировать при температуре +37 °С в течение 3 мин.

5. К смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида (имеющего температуру +37 °С) и зарегистрировать время свертывания.

Аналогично, с использованием АПТВ_{ВА-} -реагента, определить время свертывания в контрольной нормальной плазме (или РНП-плазме ООО фирмы "Технология-Стандарт", кат. № 012).

3. ЧТЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычисляют показатель **NR** по формулам:

$$R_1 = \frac{t_1}{t_2}; \quad R_2 = \frac{t_3}{t_4}; \quad NR = \frac{R_1}{R_2},$$

где: **t₁** - время свертывания плазмы больного с реагентом АПТВ_{ВА+};

t₂ - время свертывания контрольной нормальной плазмы с реагентом АПТВ_{ВА+};

t₃ - время свертывания плазмы больного с реагентом АПТВ_{ВА-};

t₄ - время свертывания контрольной нормальной плазмы с реагентом АПТВ_{ВА-};

R₁ - показатель удлинения времени свертывания у больного, в сравнении с контролем, в тесте с АПТВ_{ВА+} -реагентом;

R₂ - 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 (σ=0,10), с пределами нормальных колебаний (±2σ) **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**, высока вероятность наличия волчаночного антикоагулянта.

**УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ
И ПРИМЕНЕНИЯ**

Набор рассчитан на исследование **50-100 образцов** плазмы крови при расходе АПТВ-реагентов по 0,1-0,05 мл на анализ.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2... +8 °С в течение всего срока годности набора (**18 мес**). Допускается транспортировка при температуре до +25 °С в течение 30 сут. Замораживание не допускается.

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

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

АПТВ_{ВА-} -реагент можно хранить при комнатной температуре не более 6 ч и не более 7 дней при температуре +2... +8 °С. Замораживание не допускается.

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. - М.: "Ньюдиамед-АО", 2008. – 292 с.

2. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. – СПб.: Формат, 2006. – 208 с.

3. Момот А.П., Мамаев А.Н., Сердюк Г.В. Способ диагностики антифосфолипидного синдрома. Патент РФ №2186391 от 27 июля 2002 г.