

А. Пробы с добавлением контрольной нормальной плазмы

Ход определения:

1. К 0,05 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,05 мл контрольной нормальной плазмы, а также 0,1 мл суспензии каолина, тромбoplastина или лебетокса.

2. Пробирку встряхнуть и поместить на 30 с (при определении тромбoplastинового или лебетоксового времени) или на 3 мин (при определении каолинового времени) на водяную баню при температуре +37 °С.

3. К смеси добавить 0,1 мл 0,277 % раствора кальция хлорида и включить секундомер. Отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

Результат: При гипокоагуляции, обусловленной ВА, добавление контрольной нормальной плазмы не нормализует время свертывания. В отличие от этого, при гипокоагуляции, связанной с дефицитом плазменных факторов свертывания, происходит нормализация показателей тестов.

Б. Подтверждающие пробы с тромбоцитами (тромбоцитином)

Ход определения:

1. К 0,05 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,05 мл раствора тромбоцитина, а также 0,1 мл суспензии каолина или лебетокса.

2. Пробирку встряхнуть и поместить на 30 с (при определении тромбoplastинового или лебетоксового времени) или на 3 мин (при определении каолинового времени) на водяную баню при температуре +37 °С.

3. К смеси добавить 0,1 мл 0,277 % раствора кальция хлорида и включить секундомер. Отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки. При определении ТВРТ следует добавить 0,2 мл тромбoplastин-кальцевой смеси.

Параллельно и по аналогичной методике определить время свертывания в смеси контрольной нормальной плазмы с тромбоцитином.

Результат: При наличии ВА в подтверждающих пробах с тромбоцитином в исходно нарушенных коагуляционных тестах происходит полная или очень выраженная нормализация свертывания (в сравнении с результатом, полученным на смеси контрольной нормальной плазмы с тромбоцитином).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан для исследования не менее **200 образцов** плазмы крови.

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 1 мес с момента вскрытия его компонентов.

Суспензию легкого каолина после вскрытия флакона можно хранить при температуре +2... +8 °С не более 1 мес.

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре +2... +8 °С не более 1 мес.

Разведенный тромбoplastин можно хранить при температуре +2... +8 °С не более 2-х недель.

Тромбoplastин-кальцевую смесь можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч и при температуре +37 °С - 3 ч.

Маточный раствор лебетокса можно хранить при температуре +2... +8 °С не более 1 месяца. Рабочий раствор лебетокса можно хранить при температуре +2... +8 °С не более 3 дней.

Маточный раствор тромбоцитина можно хранить при температуре -16... -20 °С не более 2-х недель. Рабочий раствор тромбоцитина можно хранить при комнатной температуре не более 1 дня.

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

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.



Люпус-тест

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения антикоагулянтов волчаночного типа

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Люпус-тест предназначен для определения антикоагулянтов волчаночного типа (ВА). В плазме крови ВА связываются с фосфолипидными мембранами и тормозят активацию и взаимодействие между собой плазменных факторов свертывания крови. Наиболее четко эти нарушения выявляются в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах при использовании низких концентраций активаторов процесса свертывания.

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 основано на том, что гипокоагуляция, обусловленная этими ингибиторами свертывания и выявляемая фосфолипид-зависимыми тестами, не корректируется нормальной бедной тромбоцитами плазмой (БТП), но исправляется добавлением к исследуемой БТП разведенных нормальных тромбоцитов (тромбоцитина). В связи с этим используемые для диагностики ВА тесты подразделяются на следующие группы: 1) скрининговые фосфолипид-зависимые, дающие представление о нарушениях, связанных с эффектами ВА; 2) подтверждающие, в которых устанавливают, что гипокоагуляция в тестах первой группы устраняется или значительно корректируется добавлением фосфолипидных мембран, но не нормальной контрольной БТП (этим исключают гипокоагуляцию, обусловленную дефицитом плазменных факторов свертывания).

Состав набора:

1. Каолин (суспензия легкого каолина), 10 мл - 4 фл.
2. Тромбoplastин (лиофильно высушенный) - 2 фл.
3. Лебетокс (лиофильно высушенный активатор фактора X) - 1 фл.
4. Тромбоцитин (лиофильно высушенный реагент из отмытых и разрушенных тромбоцитов человека) - 2 фл.
5. Буфер для разведений (концентрированный 20:1 раствор), 10 мл - 1 фл.
6. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 5,54 %), 10 мл - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения протромбинового времени с разведенным тромбoplastином - в диапазоне от 30 до 120 с, для каолинового времени - от 50 до 300 с, для лебетоксового времени - от 30 до 120 с. Коэффициент вариации результатов определения времени свертывания по всем тестам не превышает 10 %.

Допустимый разброс результатов определения времени свертывания по всем тестам в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии не превышает 10 %.

Каталожный номер набора: **011**

ООО фирма "Технология-Стандарт"

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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.

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

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Центрифуга лабораторная;
- коагулометр (при отсутствии коагулометра - секундомер, термобаня на +37 °C);
- весы торсионные (BT-500 или аналогичные);
- ступка фарфоровая с пестиком;
- пипетки вместимостью 0,05; 0,1-1,0 и 5,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- цилиндр мерный вместимостью 200 мл;
- вода дистиллированная;
- цитратная бедная тромбоцитами плазма здорового человека, полученная в день исследования (контрольная нормальная плазма);
- 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 1000 об/мин (240 g) в течение 7 мин. Богатую тромбоцитами плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200-1400 g) в течение 15 мин, в результате получают бедную тромбоцитами плазму (БТП).

Внимание! Для получения воспроизводимых и точных результатов особое внимание должно уделяться соблюдению режима и последовательности 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. БТП используют во всех исследованиях.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1.1. Суспензия легкого каолина

Используют в готовом виде. Перед употреблением встряхивают до получения гомогенной суспензии.

1.2. Разведение буфера

Содержимое флакона с концентрированным буфером для разведений перенести в мерный цилиндр и довести объем дистиллированной водой до **200,0 мл**. В результате получают рабочий раствор буфера.

1.3. Разведение тромбопластина

Проводят в соответствии с описанием в *Паспорте к набору*.

В контрольной нормальной плазме время свертывания в тесте с разведенным тромбопластином (см. п. Проведение анализа) должно составлять **45-55 с**. При другой активности тромбопластина в пробирку дополнительно необходимо добавить тромбопластин или кальция хлорид, осуществляя подгонку активности к нужному уровню.

1.4. Разведение лебетокса

Проводят в соответствии с описанием в *Паспорте к набору*.

В норме время свертывания в лебетоксовом тесте (см. п. Проведение анализа) при мануальном исследовании должно быть равным **45-55 с**, а при исследовании на коагулометре - **35-45 с**. При другой активности яда в пробирку дополнительно ввести маточный раствор лебетокса или дистиллированную

воду, осуществляя подгонку активности яда к нужному уровню. Это предварительное тестирование раствора лебетокса следует проводить лишь на свежей цитратной бедной тромбоцитами плазме здоровых людей (контрольной нормальной плазме). Лиофилизированные и замороженные образцы контрольной плазмы, в т.ч. РНП-плазма, для этой цели не пригодны. Рекомендуется также для выполнения тестов со змеиными ядами (лебетоксом) использовать отдельные посуду, наконечники для пипеток, пробирки и коветы.

1.5. Разведение тромбоцитина

Проводят в соответствии с описанием в *Паспорте к набору*.

1.6. 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).

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

I этап - скрининговые тесты

Определение каолинового времени (КВ):

1. К 0,1 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл суспензии каолина.

2. Пробирку встряхнуть и поместить на водяную баню при температуре +37 °C.

3. Через 3 мин к смеси добавить 0,1 мл раствора кальция хлорида и включить секундомер.

4. Достать пробирку из бани и отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

Параллельно определяют каолиновое время в контрольной нормальной плазме.

Результат: Диапазон нормы КВ составляет **75 до 105 с**, однако нормативные показатели зависят от особенностей преаналитического этапа исследования, техники определения и устанавливаются в каждой лаборатории на основании исследования группы здоровых людей. Замедление свертывания в каолиновом тесте по сравнению с контролем более, чем в 1,25 раза может быть связано с действием ВА.

Определение тромбопластинового времени с “разведенным” тромбопластином (ТВРТ):

1. Предварительно приготовить смесь из раствора кальция хлорида (0,277 %) и тромбопластина (в соответствии с описанием в *Паспорте к набору*). Тромбопластин-кальциевую смесь (ТКС) прогреть на водяной бане 10-15 мин при +37 °C.

2. К 0,1 мл исследуемой плазмы крови, взятой в пробирку (предварительно прогретой в течение 30 с на водяной бане при температуре +37 °C), добавить 0,2 мл прогретой ТКС и включить секундомер. Отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

Параллельно определяют ТВРТ в контрольной нормальной плазме.

Результат: В норме тест с “разведенным” тромбопластином дает свертывание в пределах **45-55 с**. Все значения, превышающие в 1,2 раза аналогичный показатель в контрольной плазме, считают отклонением от нормы, которое может быть связано с ВА.

Определение лебетоксового времени свертывания:

1. К 0,1 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл раствора лебетокса.

2. Пробирку встряхнуть и поместить на 30 с на водяную баню при температуре +37 °C.

3. К смеси добавить 0,1 мл 0,277 % раствора кальция хлорида (предварительно прогретого на водяной бане при +37 °C) и включить секундомер. Отметить время свертывания (образования фибрина) при периодическом покачивании пробирки.

Параллельно определяют лебетоксовое время в контрольной нормальной плазме.

Результат: В норме лебетоксовое время свертывания при мануальном исследовании должно быть равным **45-55 с**, а при исследовании на коагулометре - **35-45 с**. Замедление свертывания по сравнению с контролем более, чем в 1,2 раза, может быть связано с действием ВА.

II этап - подтверждающие тесты

Определения выполняются только в тех тестах, в которых было выявлено замедление свертывания при скрининговом обследовании.