

**ИНСТРУКЦИЯ**

**по применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест) по ТУ 9398-018-05595541-2008»**

**НАЗНАЧЕНИЕ**

**Предназначенное применение.** Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест) по ТУ 9398-018-05595541-2008» (сокращенное наименование – ВА-тест) предназначен для коагулологического определения наличия ВА в плазме крови пациентов по критериям Подкомитета по Науке и Стандартизации Международного Общества Тромбоза и Гемостаза.

**Область применения.** Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

**Предназначенный пользователь.** Определение наличия ВА в плазме крови пациентов с помощью набора ВА-тест может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

**Диагностическая роль.** 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 набора**

- АЧТВс-реагент для скрининга, лиофильно высушенный (4мл) – 2 флакона;
- АЧТВп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный (2мл) – 2 флакона;
- ВАС-реагент для скрининга, лиофильно высушенный (2мл) – 2 флакона;
- ВАп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный (1мл) – 2 флакона;
- ПВс-реагент для скрининга, лиофильно высушенный (1мл) – 1 флакон;
- ПВп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный (4мл) – 1 флакон;
- Плазма контрольная, содержащая волчаночный антикоагулянт, лиофильно высушенная (1мл) – 1 флакон.

**Число анализируемых проб биологического материала**

Один набор ВА-тест предназначен для определения наличия ВА в не менее чем 40 пробах плазмы пациентов.

**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 Тромбоза и Гемостаза 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 выселяют, 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 исключения антикоагулянтного эффекта ВА (подтверждающие тесты). Укорочение времени свертывания в этом случае будет свидетельствовать о наличии в исследуемой плазме ВА.

**МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАНЫХ КОНТРОЛЬНОМУ МАТЕРИАЛУ**

Наличие волчаночного антикоагулянта в контрольной плазме устанавливали, сравнивая показатели свертывания с внутренним контрольным материалом, который в свою очередь был аттестован путем сравнения с 1-ой Международной референтной панелью, полученной из NIBSC, код 13/172.

Значения Нормализованного Отношения (НО) в Плазме контрольной, содержащей ВА указано в паспорте медицинского изделия.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

**Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения ВА: билирубин в концентрации не более 0,2 г/л, свободный гемоглобин – не более 2 г/л, триглицериды – не более 10 г/л. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно завышенных результатов.

**Воспроизводимость**

Коэффициент вариации результатов определения времени свертывания в контрольной плазме - не более 10%.

**Значения активности, соответствующие нормальным**

АЧТВс – 30-40 сек	АЧТВп – 25-35 сек
ПВс – 45-60 сек	ПВп – 14-18 сек
ВАС – 22-29 сек	ВАп – 20-26 сек

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Набор реагентов ВА-тест предназначен только для диагностики in vitro. Класс потенциального риска применения набора – 2а.

Набор реагентов ВА-тест не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с набором и образцами крови следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»; СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011 «Профилактика ВИЧ-инфекции».

**⚠** При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, так как 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 гепатита С или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Плазма контрольная, содержащая ВА получена из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее, эти компоненты набора следует рассматривать как потенциально вирус-опасные.

**⚠** ПВс, ПВп, ВАС и ВАп реагенты, входящие в набор ВА-тест, содержат консервант азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов.

**ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

- Полуавтоматический или автоматический коагулометр открытого типа с любой системой регистрации образования сгустка.
- термостат, поддерживающий температуру 37±1°C;
- центрифуга лабораторная;
- секундомер;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл и 3.8% 3-х замещенный цитрат натрия 5,5-водный (0,109 М) или
- вакуумные системы для взятия крови с 3,2% 3-х замещенным цитратом натрия 2-водным (0,109 моль/л);
- мерный цилиндр вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- кальций хлористый 0,025М раствор (5мл) (Код Р-9);
- физиологический, 0,9% раствор натрия хлористого;
- 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.

**ВАС-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.

**ВАп-реагент** внести во флакон 1 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

**Плазма контрольная, содержащая ВА.** Внести во флакон с плазмой контрольной 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при осторожном покачивании (избегать образования пены). Перед использованием раствор плазмы нужно выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут.

## ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

### Тест ПВс, ПВп.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (нормальная)	50мкл
Инкубировать при 37°C точно 2 минуты.	
ПВс-реагент или ПВп-реагент	100мкл

### Тест ВAc, ВАп.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (нормальная)	50мкл
ВAc-реагент или ВАп-реагент	50мкл
Инкубировать при 37°C точно 1 минуту.	
Кальция хлорида 0,025 М раствор	50 мкл

## РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить времена свертывания со скрининговыми и подтверждающими реагентами от момента добавления кальция хлористого до момента образования фибринового сгустка.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.

### Скрининговые тесты.

Результаты скрининговых тестов (АЧТВс, ПВс, ВAc) необходимо выразить в виде скринингового отношения (СО):

$$CO = \frac{T_0}{T_n}, \text{ где } T_0 - \text{ время свертывания плазмы больного в скрининговом тесте.}$$

$T_n$  – 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):

$$CO_{сп} = \frac{T_{cn}}{T_n}, \text{ где } T_{cn} - \text{ время свертывания смеси исследуемой плазмы больного и}$$

нормальной донорской плазмы в скрининговом тесте.

$CO_{сп} < 1,2$  свидетельствует о патологии факторов свертывания в исследуемой плазме.

$CO_{сп} > 1,2$  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):

$$PO = \frac{T_0}{T_n}, \text{ где } T_0 - \text{ время свертывания плазмы больного в подтверждающем тесте;}$$

$T_n$  – время свертывания нормального 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)

по формуле:  $HO = \frac{CO}{PO}$

Нормальное значение Нормализованного Отношения составляет 0,8 – 1,2

При  $HO < 1,2$  – волчаночный антикоагулянт отсутствует;

$HO > 1,2$  – волчаночный антикоагулянт положительный;

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. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается хранение при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные компоненты набора следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

### 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	7 дней	2 дня	3 мес.
ВAc-реагент	2 дня	8 часа	-
ВАп-реагент	2 дня	8 часа	2 мес.

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание допускается.

## ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие реагента ВА-тест требованиям Технических условий (ТУ) при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

## МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

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

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на три четверти, 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.

Наборы реагентов ВА-тест, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г»).

## ЛИТЕРАТУРА

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., «НьюДиамед», 2001. - 285 с.
- Берковский А.Л., Калашникова Л.А., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Качалова Н.Д., Васильев С.А., Орел Е.Б., Козлов А.А. Диагностика волчаночного антикоагулянта. М., 2017. - 48 с.
- Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000. - 360 с.

По вопросу, касающемуся 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)

## СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
<input type="checkbox"/>	Номер по каталогу
<input type="checkbox"/>	Медицинское изделие для диагностики in vitro
<input type="checkbox"/>	Биологический риск
<input type="checkbox"/>	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
<input type="checkbox"/>	Температурный диапазон
<input type="checkbox"/>	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

## Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.



