

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО фирма

«Технология-Стандарт»

А. П. Момот

февраль 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения антикоагулянтов волчаночного типа
(Люпус-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Люпус-тест предназначен для определения антикоагулянтов волчаночного типа (ВА). Наличие в плазме крови ВА сопровождается рецидивирующими тромбозами вен и артерий, нарушением мозгового кровообращения, фетоплацентарной недостаточностью, привычным невынашиванием беременности, тромбоцитопенией, кровоточивостью микроциркуляторного типа, полиаллергией, склонностью к развитию ДВС-синдрома.

Набор рассчитан на проведение 100 анализов при расходе рабочих растворов реагентов по 0,1 мл на 1 анализ.

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 разрушенных нормальных тромбоцитов.

СОСТАВ НАБОРА:

1. Каолин (суспензия легкого каолина), 10 мл – 4 фл.
2. Тромбопластин (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.



КОПИЯ ВЕРНА
ООО фирма «Технология-Стандарт»
Директор _____ А. П. Момот

11.03.2012

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения протромбинового времени с разведенным тромбопластином – в диапазоне от 30 до 120 с.

Линейность определения каолинового времени – в диапазоне от 50 до 300 с.

Линейность определения лебетоксового времени – в диапазоне от 30 до 120 с.

Коэффициент вариации результатов определения протромбинового, каолинового и лебетоксового времени не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения протромбинового, каолинового и лебетоксового времени в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Тест чувствителен к присутствию в крови антикоагулянтов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2 а.

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 или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Коагулометр с блоком пробоподготовки и кюветами, при отсутствии коагулометра – секундомер;
- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 3000 об./мин (1200 g);
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °C (можно использовать термостат коагулометра);
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,05 мл; 0,1-1,0 мл; 5,0 мл;
- пробирки стеклянные;
- цилиндр мерный вместимостью 200 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические;
- цитратная бедная тромбоцитами плазма здорового человека, полученная в день исследования (контрольная нормальная плазма).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% раствор натрия лимоннокислого 3-замещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия – 9:1. Кровь центрифугируют при 1000 об/мин (240 g) при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 7 мин. Богатую тромбоцитами плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют при 3000 об/мин (1200 g) при комнатной температуре в течение 15 мин.

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

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

А. Приготовление суспензии легкого каолина

Суспензия легкого каолина готова к применению и не требует каких-либо разведений. Перед проведением исследований флакон с каолином необходимо встряхнуть для получения гомогенной суспензии.

Б. Приготовление буфера для разведений

Концентрированный раствор буфера для разведений количественно перенести из флакона в мерный цилиндр и общий объем довести дистиллированной водой до 200 мл. В результате получают рабочий раствор буфера для разведений.

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

В. Приготовление рабочего раствора кальция хлорида

В день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор кальция хлорида развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды). Перед использованием рабочий раствор кальция хлорида следует инкубировать на водяной бане при температуре +37 °С в течение, как минимум, 10 мин.

Рабочий раствор кальция хлорида можно хранить при температуре +37 °С не более 4 ч.

Г. Приготовление раствора тромбопластина и тромбопластин-кальциевой смеси

Во флакон с тромбопластином внести 2,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °С) и легком покачивании в течение 3 мин. В результате получают маточную суспензию тромбопластина.

Маточную суспензию тромбопластина можно хранить при температуре +2...+8 °С не более 1 недели.

Для приготовления рабочей суспензии тромбопластина смешать в пробирке 0,1 мл маточной суспензии тромбопластина с 5,0 мл рабочего раствора буфера для разведений.

Полученную рабочую суспензию тромбопластина можно хранить при комнатной температуре в течение 8 ч.

Для приготовления тромбопластин-кальциевой смеси смешать в пробирке 0,1 мл рабочей суспензии тромбопластина с 4,0 мл рабочего раствора кальция хлорида (0,277%). Смесь прогреть на водяной бане при температуре +37 °С в течение, как минимум, 10 мин.

Полученную тромбопластин-кальциевую смесь можно хранить при температуре +37 °С не более 3 ч или при комнатной температуре - не более 8 ч.

Протромбиновое время свертывания в контрольной нормальной плазме с использованием тромбопластин-кальциевой смеси должно находиться в диапазоне 40-55 с. В случае отклонения от указанного диапазона протромбинового времени в пробирку с тромбопластин-кальциевой смесью внести маточную суспензию тромбопластина или раствор кальция хлорида для получения необходимой активности смеси.

Д. Приготовление раствора лебетокса

Во флакон с лебетоксом внести 3,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 3 мин. В результате получают маточный раствор лебетокса. Маточный раствор лебетокса после растворения необходимо выдержать при комнатной температуре в течение, как минимум, 20 мин.

Маточный раствор лебетокса можно хранить при +2...+8 °С в течение 1 мес.

Для приготовления рабочего раствора лебетокса смешать в пробирке 0,4 мл маточного раствора лебетокса с 1,5 мл дистиллированной воды.

Рабочий раствор лебетокса можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч или не более 3 дней при температуре +2... +8 °С.

Лебетоксовое время свертывания в контрольной нормальной плазме с использованием рабочего раствора лебетокса должно находиться в диапазоне 35-55 с. В случае отклонения от указанного диапазона лебетоксового времени свертывания времени в пробирку с рабочим раствором лебетокса внести маточный раствор лебетокса или дистиллированную воду для получения необходимой активности рабочего раствора лебетокса.

Е. Приготовление раствора тромбоцитина

Во флакон с тромбоцитином внести 2,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °C) и легком покачивании в течение 3 мин. В результате получают маточный раствор тромбоцитина.

Маточный раствор тромбоцитина можно хранить при -8...-20 °C в течение 2 недель.

Для приготовления рабочего раствора тромбоцитина смешать в пробирке 0,1 мл маточного раствора тромбоцитина и 2,0 мл рабочего раствора буфера для разведений. В результате получают рабочий раствор тромбоцитина.

Рабочий раствор тромбоцитина можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

А. Определение каолинового времени свертывания

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл исследуемой плазмы и прогреть ее при +37 °C в течение 1 мин.

2. В кювету добавить 0,1 мл суспензии каолина, имеющей комнатную температуру.

3. Через 3 мин к смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида, имеющего температуру +37 °C, и зарегистрировать время свертывания.

Параллельно определяют каолиновое время в контрольной нормальной плазме.

В нормальной плазме каолиновое время составляет 75-105 с.

Замедление свертывания в каолиновом тесте по сравнению с контролем более чем в 1,25 раза, может быть связано с действием ВА.

Б. Определение протромбинового времени с разведенным тромбопластином

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл исследуемой плазмы и прогреть ее при температуре +37 °C в течение 1 мин.

3. В кювету добавить 0,2 мл тромбопластин-кальциевой смеси, имеющей температуру +37 °C, и зарегистрировать время свертывания.

Параллельно определяют протромбинового времени с разведенным тромбопластином в контрольной нормальной плазме.

В нормальной плазме протромбиновое время с разведенным тромбопластином находится 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.

В. Определение лебетоксового времени свертывания

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл исследуемой плазмы и 0,1 мл раствора лебетокса, смесь прогреть при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 мин.

2. В кювету коагулометра добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида, имеющего температуру $+37^{\circ}\text{C}$, и зарегистрировать время свертывания.

Параллельно определяют лебетоксовое время в контрольной нормальной плазме.

В нормальной плазме лебетоксовое время свертывания находится в пределах 35-55 с.

Замедление свертывания по сравнению с контролем более чем в 1,2 раза, может быть связано с действием ВА.

Г. Проба с добавлением контрольной нормальной плазмы

1. В кювету коагулометра внести 0,05 мл исследуемой плазмы, добавить 0,05 мл контрольной нормальной плазмы, а также 0,1 мл суспензии каолина или тромбопластина, или лебетокса.

2. Через 1 мин (при определении протромбинового или лебетоксового времени) или через 3 мин (при определении каолинового времени) к смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида и зарегистрировать время свертывания.

При гипокоагуляции, обусловленной ВА, добавление контрольной нормальной плазмы не нормализует время свертывания. При гипокоагуляции, связанной с дефицитом плазменных факторов свертывания, происходит нормализация показателей тестов.

Д. Проба с тромбоцитином

1. В кювету коагулометра внести 0,05 мл исследуемой плазмы, добавить 0,05 мл рабочего раствора тромбоцитина, а также 0,1 мл суспензии каолина или тромбопластина или лебетокса.

2. Через 1 мин (при определении протромбинового или лебетоксового времени) или через 3 мин (при определении каолинового времени) к смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора кальция хлорида и зарегистрировать время свертывания.

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

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

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Хранение набора должно проводиться при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора (18 мес). Допускается хранение при температуре до $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Суспензию легкого каолина после вскрытия флакона можно хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес.

Маточный и рабочий растворы буфера для разведений можно хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес.

Рабочий раствор кальция хлорида можно хранить при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 4 ч, при комнатной температуре не более 1 сут., при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 2 сут.

Не допускается сливание остатков рабочего раствора кальция хлорида после дня работы с герметично закрытым и хранящимся при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ раствором.

Рабочую суспензию тромбопластина можно хранить при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не более 8 ч, при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ - не более 3-х суток.

Тромбопластин-кальциевую смесь можно хранить при температуре $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 3 ч или при комнатной температуре - не более 8 ч.

Маточный раствор лебетокса можно хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца.

Рабочий раствор лебетокса можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч и при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 3 дней.

Маточный раствор тромбоцитина можно хранить при $-8...-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 недель.

Рабочий раствор тромбоцитина можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов Люпус-тест, следует обращаться в:

1. ООО фирму «Технология-Стандарт» по адресу: 656037, г. Барнаул, а/я 1351; тел.: (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39 или
2. Испытательный лабораторный центр ФГУ «НИИ ФХМ» ФМБА России по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а; тел.: (499) 246-44-01; 246-44-09.

Министр

th

Мед. испытания проведены:
Главный врач НУЗ Отделенческая
клиническая больница на ст. Барнаул
ОАО «РЖД» к.м.н.

А.Г. Зальцман



Прошито, пронумеровано и скреплено
печатью 8/000000 листов
Руководитель Клименко
«11» 03 2018 г.

