



Інструкція
з використання набору реагентів
для визначення антикоагулянтів вовчакового типу
ЛЮПУС-ТЕСТ

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Тільки для професійного використання.

Набір розрахований на 200 визначень при витраті робочого розчину відповідно цієї методики.

Принцип методу

Визначення ВА засновано на тому, що гіпокоагуляція, обумовлена цими інгібіторами згортання і виявляється фосфоліпід-залежними тестами, не коригується нормальною бідною тромбоцитами плазмою (БТП), але виправляється додаванням до досліджуваної БТП зруйнованих нормальних тромбоцитів (тромбоцитіна). У зв'язку з цим ВА тести, що

використовуються для діагностики, підрозділяються на наступні групи:

- 1) скринінгові фосфоліпід-залежні, що дають уявлення про порушення, пов'язані з ефектами ВА;
- 2) підтверджуючі, в яких встановлюють, що гіпокоагуляція в тестах першої групи усувається або значно коригується додаванням фосфоліпідних мембран, але не нормальної контрольної БТП (цим виключають гіпокоагуляцію, обумовлену дефіцитом плазмових факторів згортання).

Призначення

Набір Люпус-тест призначений для визначення антикоагулянтів вовчакового типу (ВА). У плазмі крові ВА зв'язуються з фосфоліпопротеїдними мембранами і гальмують активацію і взаємодію між собою плазмових факторів згортання крові. Найчастіше ці порушення виявляються в фосфоліпід-залежних коагуляційних тестах при використанні низьких концентрацій активаторів процесу згортання. Наявність в плазмі ВА супроводжується рецидивуючими тромбозами вен і артерій, порушеннями мозкового кровообігу (головні болі, непритомність, динамічні розлади мозкового кровообігу, парези, епісіндром, порушення зору та ін.), фетоплацентарною недостатністю, звичним невиношуванням вагітності (викидні, внутрішньоутробна загибель плода), тромбоцитопенією, рідше - кровоточивістю мікроциркуляторного типу, поліалергією, іншими імунними порушеннями, схильністю до розвитку ДВЗ-синдрому.

Склад набору

1. Каолін (суспензія легкого каоліну) 10 ml (мл) - 4 фл.
2. Тромбопластин (ліофільно висушений) - 2 фл.
3. Лебетокс (ліофільно висушений активатор фактору X) - 1 фл.
4. Тромбоцитін (ліофільно висушений реагент з відмитих і зруйнованих тромбоцитів людини) - 2 фл.
5. Буфер для розведення (концентрований 20:1 розчин), 10 ml (мл) - 1 фл.
6. Кальцію хлорид (концентрований 20:1 розчин, 5.54%), 10 ml (мл) - 1 фл.
7. Інструкція з використання.
8. Паспорт.

Аналітичні характеристики

Лінійність визначення протромбінового часу з розведеним тромбопластином - в діапазоні від 30 до 120 s (с), для каолінового часу - від 50 до 300 s (с), для лебетоксового часу - від 30 до 120 s (с).

Коефіцієнт варіації результатів визначення часу згортання по всім тестам не перевищує 10%.

Допустимий розкид результатів визначення часу згортання за всіма тестами в одній пробі плазми крові різними наборами однієї серії не перевищує 10%.

Перелік необхідного устаткування

- центрифуга лабораторна;
- коагулометр (при відсутності коагулометра - секундомір, термобаня на +37°C);
- ваги торсіонні (BT-500 або аналогічні);
- ступка фарфорова з товкачиком;
- піпетки місткістю 0.05; 0.1-1 і 5 ml (мл);

- пробірки скляні;
- циліндр мірний місткістю 200 ml (мл);
- цитратна бідна тромбоцитами плазма здорової людини, отримана в день дослідження (контрольна нормальна плазма).

Підготовка зразків

Кров для дослідження забирають з ліктьової вени в пластикову або силіконову пробірку, що містить 3.2% розчин натрію лимоннокислого трьох заміщеного (цитрату натрію), співвідношення об'ємів крові і цитрату натрію - 9:1. Кров центрифугують при 1000 г/min (об/хв) (240 g) протягом 7 min (хв). Багату тромбоцитами плазму переносять в іншу пробірку і повторно центрифугують при 3000 – 4000 г/min (об/хв) (1200-1400 g) протягом 15 min (хв), в результаті отримують бідну тромбоцитами плазму (БТП).

Увага! Для отримання відтворюваних і точних результатів особлива увага повинна приділятися дотриманню режиму і послідовності центрифугування.

Центрифугування має проводитися безпосередньо після взяття крові, а відбір плазми на дослідження – відразу ж після центрифугування. Не допускається аналіз плазми хворих, що містить гепарин, що має згустки, гемоліз і отриманої більше 2 h (год) тому, а також замороженої плазми крові. БТП використовують у всіх дослідженнях.

Підготовка реагентів

1. Суспензія легкого каоліну.

Використовують в готовому вигляді. Перед вживанням струшують до отримання гомогенної суспензії.

2. Розведення буфера.

Вміст флакона з концентрованим буфером для розведення перенести в мірний циліндр і довести об'єм дистильованою водою до 200 ml (мл). В результаті отримують робочий розчин буфера.

3. Розведення тромбопластина.

У флакон з тромбопластином додати 2 ml (мл) дистильованої води і перемішати без збовтування протягом хвилини. Для приготування тромбопластин-кальцієвої суміші необхідно змішати 0.1 ml (мл) розведеного тромбопластину з 3 ml (мл) кальцію хлориду. У контрольній нормальній плазмі час згортання в тесті з розведеним тромбопластином (див. п. Проведення аналізу) має становити 45-55 s (с) при іншій активності тромбопластину в пробірку додатково ввести тромбопластин або кальцію хлорид, здійснюючи підгонку активності до потрібного рівня.

4. Розведення лебетоксу.

У флакон внести 2 ml (мл) дистильованої води і розчинити вміст при кімнатній температурі 18-25°C і легкому погойдуванні протягом 20 min (хв). Робочий розчин лебетокс (далі за текстом - розчин лебетокс) отримати шляхом змішування в пробірці 0.2 ml (мл) маточного розчину з 2 ml (мл) дистильованої води.

У нормі час згортання в лебетоксовому тесті (див. п. Проведення аналізу) при мануальному дослідженні має бути рівним 45-55 s (с), а при дослідженні на коагулометрі - 35-45 s (с). При іншій активності отрути в пробірку додатково ввести маточний розчин лебетоксу або дистильовану воду, здійснюючи підгонку активності отрути до потрібного рівня. Це попереднє тестування розчину лебетоксу слід проводити лише на свіжій цитратній бідній тромбоцитами плазмі здорових людей (контрольній нормальній плазмі). Ліофілізовані і заморожені зразки контрольної плазми, в т.ч. РНП-плазма, для цієї мети не придатні. Рекомендується також для виконання тестів зі змінними отрутами (лебетокс) використовувати окремі посуд, наконечники для піпеток, пробірки і кювети.

5. Розведення тромбоцитіну.

В один флакон з тромбоцитіном внести 2 ml (мл) дистильованої води і розчинити вміст при кімнатній температурі і легкому погойдуванні протягом 3 min (хв). В результаті отримують матковий розчин тромбоцитіна, який розливають по 0.2 ml (мл) в пластикові або скляні флакони і заморожують при -20°C на термін до 2 wk (тижд). Другий флакон з тромбоцитіном використовувати аналогічно першому по необхідності. Перед використанням один з флаконів з маточним розчином тромбоцитіна розморозити при кімнатній температурі і внести в нього 2 ml (мл) робочого розчину буфера. В результаті отримують робочий розчин тромбоцитіна, який зберігають при кімнатній температурі і використовують в день дослідження для проведення підтверджуючих тестів.

6. Приготування робочого розчину кальцію хлориду.

У день дослідження, відповідно з потребою, концентрований розчин кальцію хлориду з флакона розвести дистильованою водою в 20 разів (1 об'єм концентрованого розчину + 19 об'єм води), отримують робочий (0.277%) розчин кальцію хлориду (далі по тексту - розчин кальцію хлориду).

Проведення аналізу

I етап - скринінгові тести.

Визначення каолінового часу (КЧ):

1. До 0.1 ml (мл) досліджуваної плазми, взятої в пробірку, додати 0.1 ml (мл) суспензії каоліну.
 2. Пробірку струсити і помістити на водяну баню при температурі 37°C.
 3. Через 3 min (хв) до суміші додати 0.1 ml (мл) розчину хлориду кальцію і включити секундомір.
 4. Дістати пробірку з бані і зафіксувати час згортання (утворення фібрину) при періодичному погойдуванні пробірки. Паралельно визначають каоліновий час в контрольній нормальній плазмі.
- Результат: Діапазон норми КЧ становить від 75 s (с) до 105 s (с), проте нормативні показники залежать від особливостей преаналітичного етапу дослідження, техніки визначення і встановлюються в кожній лабораторії на підставі дослідження групи здорових людей. Уповільнення згортання в каоліновому тесті в порівнянні з контролем більше, ніж в 1.25 рази може бути пов'язано з дією ВА.

Визначення тромбoplastинового часу з "розведеним" тромбoplastином (ТЧРТ):

1. Попередньо приготувати суміш з розчину кальцію хлориду (0.277%) і тромбoplastина (відповідно з описом в Паспорті до набору). Тромбoplastин-кальцієву суміш (ТКС) прогріти на водяній бані 10 - 15 min (хв) при 37°C.
 2. До 0.1 ml (мл) досліджуваної плазми крові, взятої в пробірку (попередньо прогрітій протягом 30 s (с) на водяній бані при температурі 37°C), додати 0.2 ml (мл) прогрітої ТКС і включити секундомір. Відзначити час згортання (утворення фібрину) при періодичному погойдуванні пробірки. Паралельно визначають ТЧРТ в контрольній нормальній плазмі.
- Результат: У нормі тест з "розведеним" тромбoplastином дає згортання в межах 45-55 s (с). Всі значення, що перевищують в 1.2 рази аналогічний показник в контрольній плазмі, вважають відхиленням від норми, яке може бути пов'язане з ВА.

Визначення лебетоксового часу згортання:

1. До 0.1 ml (мл) досліджуваної плазми, взятої в пробірку, додати 0.1 ml (мл) розчину лебетоксу.
 2. Пробірку струсити і помістити на 30 s (с) на водяну баню при температурі 37°C.
 3. До суміші додати 0.1 ml (мл) 0.277% розчину кальцію хлориду (попередньо прогрітого на водяній бані при 37°C) і включити секундомір. Відзначити час згортання (утворення фібрину) при періодичному погойдуванні пробірки. Паралельно визначають лебетоксовий час в контрольній нормальній плазмі.
- Результат: У нормі лебетоксовий час згортання при мануальному дослідженні має бути рівним 45 – 55 s (с), а при дослідженні на коагулометрах - 35-45 s (с). Уповільнення згортання в порівнянні з контролем більше, ніж в 1.2 рази, може бути пов'язано з дією ВА.

II етап - підтверджуючі тести

Визначення виконуються тільки в тих тестах, в яких було виявлено уповільнення згортання при скринінговому обстеженні.

A. Проби з додаванням контрольної нормальної плазми

Хід визначення:

1. До 0.05 ml (мл) досліджуваної плазми, взятої в пробірку, додати 0.05 ml (мл) контрольної нормальної плазми, а також 0.1 ml (мл) суспензії каоліну, тромбoplastину або лебетоксу.
 2. Пробірку струсити і помістити на 30 s (с) (при визначенні тромбoplastинового або лебетоксового часу) або на 3 min (хв) (при визначенні каолінового часу) на водяну баню при температурі 37°C.
 3. До суміші додати 0.1 ml (мл) 0.277% розчину кальцію хлориду і включити секундомір.
- Зафіксувати час згортання (утворення фібрину) при періодичному погойдуванні пробірки. Результат: При гіпокоагуляції, обумовленої ВА, додавання контрольної нормальної плазми трохи нормалізує час згортання. На відміну від цього, при гіпокоагуляції, пов'язаній з дефіцитом плазмових факторів згортання, відбувається нормалізація показників тестів.

Б. Підтверджуючі проби з тромбоцитами (тромбоцитіном)

Хід визначення:

1. До 0.05 ml (мл) досліджуваної плазми, взятої в пробірку, додати 0.05 ml (мл) розчину тромбоцитіну, а також 0.1 ml (мл) суспензії каоліну або лебетоксу.
 2. Пробірку струсити і помістити на 30 s (с) (при визначенні тромбoplastинового або лебетоксового часу) або на 3 min (хв) (при визначенні каолінового часу) на водяну баню при температурі 37°C.
 3. До суміші додати 0.1 ml (мл) 0.277% розчину кальцію хлориду і включити секундомір.
- Відзначити час згортання (утворення фібрину) при періодичному погойдуванні пробірки. При визначенні ТЧРТ слід додати 0.2 ml (мл) тромбoplastин-кальцієвої суміші.

Паралельно і за аналогічною методикою визначити час згортання в суміші контрольної нормальної плазми з тромбоцитіном.

Результат: При наявності ВА в підтверджуючих пробах з тромбоцитіном в початково порушених коагуляційних тестах відбувається повна або дуже виражена нормалізація згортання (в порівнянні з результатом, отриманим на суміші контрольної нормальної плазми з тромбоцитіном).

Зберігання та стабільність

Набір розрахований для дослідження не менше 200 зразків плазми крові. Зберігання набору повинно проводитися при температурі 2-8°C протягом усього терміну придатності набору 18 mth (міс). Під час використання реагентів запобігати забруднення та потрапляння прямих сонячних променів. Заморожування не допускається.

Час використання набору не повинен перевищувати 1 mth (міс) з моменту розкриття його компонентів. Суспензію легкого каоліну після розкриття флакону можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 1 mth (міс). Робочий розчин буферу можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 1 mth (міс). Розведений тромбопластин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 2 wk (тижд). Тромбопластин-кальцієву суміш можна зберігати при кімнатній температурі не більше 8 h (год) і при температурі 37°C - 3 h (год). Маточний розчин лебетоксу можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 1 mth (міс).

Робочий розчин лебетоксу можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 d (доб).

Маточний розчин тромбоцитіну можна зберігати при температурі -20 ° C не більше 2 wk (тижд).

Робочий розчин тромбоцитіну можна зберігати при кімнатній температурі не більше 1 d (доб). Робочий розчин кальцію хлориду можна зберігати при кімнатній температурі не більше 1 d (доб) або в герметично закритому флаконі не більше 2 d (доб) при температурі 2-8°C.

Вимоги безпеки та утилізації

1. Уникати потрапляння в рот, очі та на шкіру. В разі потрапляння, промити великою кількістю води та звернутися за консультацією до лікаря.

2. Використовувати засоби індивідуального захисту при роботі з набором.

3. Знезараження та утилізація реагентів, сироваток, тестових слайдів чи скляних пластин проводити згідно з чинним законодавством.

Транспортування

Набори транспортують всіма видами закритого транспорту при температурі до 25°C.

Допускається транспортування при середньодобової температурі 37°C не більше 72 h (год).

Гарантії виробника


1. Виробник гарантує відповідність якості наборів вимогам ТУ при додержанні споживачем умов зберігання.

2. Гарантійний термін зберігання становить 18 mth (міс) з дня виготовлення набору.








Література

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.

 ТОВ «Лабораторія Гранум», Україна, 61001, м. Харків, вул. Франківська, 14,
тел/факс: (057) 752-32-31, електронна адреса: granumlab@gmail.com

Символи на продукції

 Виробник	Виготовлено: Дата виробництва	Придатно до: Термін придатності	Серія: Номер
серії  Виріб медичний для діагностики in vitro	 Консультуйтеся з інструкцією із використання		
 Берегти від сонячного світла	 Знак відповідності Технічним регламентам	 Температурне	
обмеження  Засторога. Зверніться до інструкції з використання для отримання інформації щодо застережень, попереджень, запобіжних заходів			