



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест) по ТУ 9398-018-0559541-2008»

### НАЗНАЧЕНИЕ

**Предназначенное применение.** Медицинское изделие для диагностики in vitro «Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта (ВА-тест) по ТУ 9398-018-0559541-2008» (сокращенное наименование – ВА-тест) предназначен для выявления ВА в плазме крови пациентов коагулологическими методами.

**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.

**Научная обоснованность теста.** В основу метода определения ВА положено его свойство ингибировать фосфолипиды, удлинняя 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 скрининговых коагуляционных тестов;
- отсутствие коррекции удлинения теста при смешивании исследуемого образца с нормальной плазмой;
- коррекция удлинения теста при избытке фосфолипидов;
- отсутствие специфических ингибиторов любых факторов свертывающей системы крови.

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

### ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### Состав набора

АЧТВс-реагент для скрининга, лиофильно высушенный – 4,0 мл/флакон – 2 флакона;  
 АЧТВп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный – 2,0 мл/флакон – 2 флакона;  
 ВАС-реагент для скрининга, лиофильно высушенный – 2,0 мл/флакон – 2 флакона;  
 ВАп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный – 1,0 мл/флакон – 2 флакона;  
 ПВс-реагент для скрининга, лиофильно высушенный – 1,0 мл/флакон – 1 флакон;  
 ПВп-реагент для подтверждения, лиофильно высушенный – 4,0 мл/флакон – 1 флакон;  
 Плазма контрольная, содержащая волчаночный антикоагулянт, лиофильно высушенная – 1,0 мл/флакон – 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

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 выясняют, 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 истощения 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.

### 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.

#### Точность

Нормализованное отношение (НО) при исследовании Плазмы контрольной, содержащей ВА, равно или более 1,2. Значения НО в Плазме контрольной, содержащей ВА указано в паспорте медицинского изделия.

#### Значения времени свертывания, 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

#### Ограничения метода

Клиническая диагностика не должна основываться только на результатах определения ВА набором ВА-тест. При постановке диагноза должны быть рассмотрены клинические симптомы и другая значимая тестовая информация.

### 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».

⚠ 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, не следует исключать остаточного минимального риска при работе с набором, поскольку плазма крови человека является потенциально опасным биологическим материалом.

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.

### 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 стекляннной 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 - 200С.

#### 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 тромбобластин в 10 раз физиологическим раствором (0,1 мл тромбобластина + 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 ВАС, ВАп.

Внести в кювету анализатора:	Объем
Плазма исследуемая (нормальная)	50мкл
ВАС-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, ВАС) необходимо выразить в виде скринингового отношения (СО):

$$CO = \frac{T_{\delta}}{T_n}$$

$T_n$  – 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, ВАС. Рассчитать скрининговое отношение смеси плазм (СО<sub>сп</sub>):

$$CO_{sp} = \frac{T_{сп}}{T_n}$$

мальной донорской плазмы в скрининговом тесте.

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

$CO_{sp} > 1,2$  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):

$$PO = \frac{T_{\delta}}{T_n}$$

$T_n$  – время свертывания нормальной 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)

$$HO = \frac{CO}{PO}$$

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 допускается. Изделия, хранящиеся 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 суток	2 суток	2 месяца
АЧТВп-реагент	14 суток	2 суток	2 месяца
ПВс-реагент	2 часа	-	-
ПВп-реагент	7 суток	2 суток	3 месяца
ВАС-реагент	2 суток	8 часа	-
ВАп-реагент	2 суток	8 часа	2 месяца
Плазма контрольная	8 часов	4 часа	2 месяца

Транспортирование наборов ВА-тест должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается транспортирование набора при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание наборов допускается

## ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов 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»). Диагностические средства собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного) в соответствии с требованиями нормативных документов в зависимости от класса опасности отходов. Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

## СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Номер по каталогу
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Биологический риск
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

Дата утверждения инструкции 9 сентября 2008 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.
- Зубанов Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000. - 360 с.

## ПЕРЕЧЕНЬ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕМ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ

- ГОСТ Р 51088-2013. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
- ГОСТ Р 17511-2011. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам.
- ГОСТ Р 51352-2013. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
- ГОСТ Р ИСО 23640-2015. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
- ГОСТ Р ЕН 13612-2010. Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.
- ГОСТ Р ЕН 13641-2010. Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro.
- ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
- ГОСТ Р ИСО18113-2-2015. Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация. Предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014. Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
- Приказ Минздрава России от 19.01.2017 г №11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинских изделий».

По вопросам, касающимся 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)

## Алгоритм выявления волчаночного антикоагулянта.

