

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения активированного парциального (частичного) тромбопластинового времени и каолинового времени свертывания (АВР)

АПТВ(АЧТВ)-тест *на 100 и 500 определений*

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор АПТВ-тест предназначен для выполнения базовой методики исследования системы гемостаза - определения активированного парциального (частичного) тромбопластинового времени (АПТВ или АЧТВ). Определение АПТВ используется для выявления гипер- и гипокоагуляционного сдвига, контроля за гепаринотерапией при тромбозах, тромбоземболиях и ДВС-синдромах различной этиологии, для диагностики гемофилии (дефицит факторов VIII, IX, XI), болезни Виллебранда.

Реагенты набора могут использоваться для определения каолинового времени свертывания бедной и богатой тромбоцитами плазмы (активированного времени рекальцификации - АВР).

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода АПТВ(АЧТВ). Определяется время свертывания плазмы крови в условиях стандартизированной контактной (каолином) и фосфолипидной (кефалином) активации процесса в присутствии ионов кальция.

Состав набора

на 100 определений

1. Кефалин (лиофильно высушенный фосфолипидный компонент) - 2 фл.
2. Каолин (концентрированная суспензия 40:1 в дистиллированной воде), 1,0 мл - 1 фл.
3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 2,0 мл - 1 фл.
4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М) - 2,0 мл - 1 фл.

на 500 определений

1. Кефалин (лиофильно высушенный фосфолипидный компонент) - 2 фл.
2. Каолин (концентрированная суспензия 200:1 в дистиллированной воде), 1 мл - 1 фл.
3. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1 раствор, 1 М), 10 мл - 1 фл.
4. Кальция хлорид (концентрированный 20:1 раствор, 0,5 М) - 10 мл - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения - в диапазоне от 30 до 300 с.

Коэффициент вариации результатов определения АПТВ не превышает 6%.

Допустимый разброс результатов определения АПТВ в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10%.

Тест чувствителен к присутствию в крови антикоагулянтов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- коагулометр;
- при отсутствии коагулометра - секундомер, термобаня на 37° С;
- пипетки вместимостью 0,1 мл; 5,0 мл;
- пробирки стеклянные, цилиндр мерный вместимостью 200 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Допускается для получения бедной тромбоцитами плазмы однократное центрифугирование крови при 3000-4000 об/мин (1200g) в течение 15 мин.

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

Примечание: *Бедная тромбоцитами плазма получается для определения АПТВ(АЧТВ) и каолинового времени бедной тромбоцитами плазмы. Богатая тромбоцитами плазма может быть использована для определения каолинового времени в такой плазме (или АВР).*

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ АПТВ(АЧТВ)

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

А. Разведение кефалина

В один флакон с кефалином внести 1,0 мл (в наборе на 100 опред.) или 2,0 мл (в наборе на 500 опред.) дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18...+25°С) и энергичном покачивании в течение 2 мин. В результате получают раствор кефалина, который до использования должен быть выдержан при комнатной температуре в течение 60 мин.

Б. Приготовление АПТВ-реагента

Вариант для набора на 100 опред.

1. Концентрированный буфер трис-НСI и концентрированную суспензию каолина количественно перенести из флаконов в мерный цилиндр и общий объем довести дистиллированной водой до 40 мл. В результате получают рабочую суспензию каолина.

2. Для приготовления АПТВ-реакента смешать в пробирке 0,05 мл раствора кефалина с 0,6 мл рабочей суспензии каолина.

Вариант для набора на 500 опред.

1. Концентрированный буфер трис-НСI и концентрированную суспензию каолина количественно перенести из флаконов в мерный цилиндр и общий объем довести дистиллированной водой до 200 мл. В результате получают рабочую суспензию каолина.

2. Для приготовления АПТВ-реакента смешать в пробирке 0,1 мл раствора кефалина с 3,0 мл рабочей суспензии каолина.

Полученный АПТВ-реакент можно использовать не более 1 дня в условиях хранения при комнатной температуре (+18...+25°C) и не более 2 дней - при температуре +2...+8°C. Перед применением АПТВ-реакент встряхнуть.

В. Приготовление рабочего раствора хлорида кальция

В день исследования, в соответствии с потребностью, концентрированный раствор хлорида кальция развести дистиллированной водой в 20 раз (1 объем концентрированного раствора + 19 объемов воды).

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

Коагулометрический вариант.

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 АПТВ-реакента, имеющего комнатную температуру.

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

Мануальный вариант.

1. К 0,1 мл исследуемой плазмы, взятой в пробирку, добавить 0,1 мл АПТВ-реакента.

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

3. Через 3 мин к смеси добавить 0,1 мл рабочего раствора хлорида кальция (имеющего температуру +37°C) и включить секундомер.

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

Нормативные показатели АПТВ зависят от техники определений. При мануальном тестировании АПТВ в нормальной плазме составляет 32-42 с, при коагулометрическом - 28-38 с, в зависимости от типа коагулометра.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор в разной комплектации рассчитан на проведение 100 или 500 анализов при расходе рабочих растворов реакентов по 0,1 мл на 1 анализ.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности набора (18 мес.). Допускается хранение при температуре до +25°C в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Время использования набора не должно превышать 2 мес с момента вскрытия его компонентов, а при дробном использовании предварительно разведенных и замороженных компонентов набора - 4 мес (см. ниже).

Раствор кефалина можно хранить при температуре +2...+8°C не более 1 мес. Для увеличения срока годности разведенного кефалина (из одного флакона) с 1 до 2 мес рекомендуется сразу после разведения разделить раствор кефалина на 2 равные части, одну из которых в герметично закрытом виде хранить при температуре -8...-20°C.

Рабочую суспензию каолина можно хранить при температуре +2...+8°C не более 1 мес. Для увеличения срока годности рабочей суспензии каолина с 1 до 4 мес рекомендуется разделить ее сразу после приготовления на 4 равные части, три из которых в герметично закрытом виде хранить при температуре -8...-20°C.

АПТВ-реакент (каолин-кефалиновую смесь) можно хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 1 дня или не более 2 дней при температуре +2...+8°C.

Концентрированный раствор хлорида кальция можно хранить при температуре +2...+8°C не более 2 мес при условии герметизации флакона. Для увеличения срока годности концентрированного раствора хлорида кальция с 2 до 4 мес рекомендуется разделить его после вскрытия флакона на 2 равные части, одну из которых в герметично закрытом виде хранить при температуре -8...-20°C.

Рабочий раствор хлорида кальция можно хранить при комнатной температуре (+18...+25°C) не более 1 дня или не более 2 дней при температуре +2...+8°C. Не допускается сливание остатков этого раствора после дня работы с герметично закрытым и хранящимся при температуре +2...+8°C раствором.

ВАРИАНТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕАГЕНТОВ НАБОРА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАОЛИНОВОГО ВРЕМЕНИ СВЕРТЫВАНИЯ

С помощью разведенных по п. 1 реактивов набора может быть выполнено определение каолинового времени свертывания:

- богатой тромбоцитами плазмы (АВР);

- бедной тромбоцитами плазмы.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

В кювету коагулометра или в пробирку (при мануальном определении) внести 0,1 мл исследуемой плазмы и инкубировать при температуре +37°C в течение 1 мин, затем добавить 0,1 мл рабочей суспензии каолина, имеющей комнатную температуру, и инкубировать дополнительно в течение 3 мин. После этого внести в смесь 0,1 мл рабочего раствора хлорида кальция (имеющего температуру +37°C), включить секундомер или таймер коагулометра и определить время свертывания.

Нормативные показатели каолинового времени свертывания зависят от содержания в плазме тромбоцитов, техники определения и устанавливаются в каждой лаборатории на основе исследования группы здоровых людей.