



ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов для определения активности фактора IX в плазме крови

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Тех-Фактор IX-тест предназначен для количественного определения коагуляционного фактора IX в плазме крови. Определение фактора IX используется для диагностики гемофилии В, для контроля заместительной терапии больных гемофилией В концентратами фактора IX.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Определяют время свертывания плазмы крови в смеси, содержащей дефицитную по фактору IX плазму, разведенную исследуемую плазму и АПТВ-реагент, в присутствии ионов кальция. Количественное определение активности фактора IX выполняют по графику зависимости активности фактора IX (в %) от времени свертывания в АПТВ-тесте.

Состав набора:

1. Дефицитная по фактору IX плазма (лиофильно высушенная плазма крови человека, уровень фактора IX в которой не выше 1 %), на 2 мл - 1 фл.
2. Контрольная плазма (лиофильно высушенная контрольная плазма крови человека с установленной активностью фактора IX), на 1 мл - 1 фл.
3. АПТВ-реагент (раствор эллаговой кислоты, содержащий мозговые фосфолипиды кролика), 2,5 мл - 1 фл.
4. Кальция хлорид 0,025 М, 10 мл - 1 фл.
5. Буфер трис-НСI (концентрированный 20:1; 1 М, pH 7,4), 5 мл - 1 фл.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейность определения - в диапазоне от 1 до 100 %.
Коэффициент вариации результатов определения АПТВ не превышает 10 %.
Допустимый разброс результатов определения уровня фактора IX 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 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

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.

Все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями МУ-287-113.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ

- Коагулометр (при отсутствии коагулометра - секундомер, термобаня на +37 °С);
- центрифуга лабораторная;
- пипетки вместимостью 0,1, 0,5 и 0,2-1,0 мл;
- мерный цилиндр на 100 мл;
- пробирки стеклянные;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические.

Каталожный номер набора: **679**

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8 % раствор натрия лимоннокислого трёхзамещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия - 9:1. Кровь центрифугируют при 3000-4000 об/мин (1200 г) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, которую переносят в другую пробирку, где хранят до проведения исследования.

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.

Перед проведением анализа все исследуемые образцы развести рабочим раствором буфера в 5 раз (**0,1 мл** образца + **0,4 мл** рабочего раствора буфера).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

1.1. Разведение дефицитной по фактору IX плазмы

Во флакон с дефицитной по фактору IX плазмой внести **2,0 мл** дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре в течение 3 мин. Перед использованием дефицитная по фактору IX плазма должна быть выдержана при комнатной температуре в течение 15 мин.

1.2. Разведение контрольной плазмы

Во флакон с контрольной плазмой внести **1,0 мл** дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре (+18... +25 °С) в течение 3 мин. Перед использованием контрольная плазма должна быть выдержана при комнатной температуре в течение 15 мин.

1.3. Приготовление АПТВ-реагента

АПТВ-реагент готов к применению, перед использованием встряхнуть.

1.4. Приготовление раствора кальция хлорида

Кальция хлорид готов к применению.

1.5. Разведение концентрированного буфера

Содержимое флакона с концентрированным буфером трис-НСI перенести в мерный цилиндр и довести объем дистиллированной водой до **100,0 мл**. В результате получают рабочий раствор буфера.

Приготовление разведений контрольной плазмы для построения калибровочного графика

Пробирка, №	1	2	3	4	5	6
Буфер, мл	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Контрольная плазма с аттестованным значением активности фактора IX (100 %)	0,2 мл	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Перемешать и перенести в другую пробирку	▼ ⊞ 0,5мл	▲▼ ⊞ 0,5мл	▲▼ ⊞ 0,5мл	▲▼ ⊞ 0,5мл	▲▼ ⊞ 0,5мл	▲ ⊞ 0,1мл
Получаемое разведение	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:500
Активность фактора IX	100 %	50 %	25 %	12,5 %	6,25 %	1 %

1.6. Построение калибровочной кривой

Для каждого разведения контрольной плазмы выполнить определения дважды, средний результат отметить на калибровочной кривой. Соединить нанесенные точки.

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Коагулометрический вариант:

1. В кювету коагулометра внести 0,1 мл разведенной в 5 раз исследуемой плазмы (или одного из разведений контрольной плазмы при построении калибровочного графика).

2. В кювету добавить 0,1 мл дефицитной по фактору IX плазмы и прогреть смесь при +37 °С в течение 1 мин.

3. В кювету добавить 0,1 мл АПТВ-реагента, имеющего комнатную температуру.

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

5. Используя калибровочную кривую, найти активность фактора IX.

Мануальный вариант:

1. К 0,1 мл разведенной в 5 раз исследуемой плазмы (или одного из разведений контрольной плазмы при построении калибровочного графика), взятой в пробирку, добавить 0,1 мл дефицитной по фактору IX плазмы и 0,1 мл АПТВ-реагента.

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

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

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

5. Используя калибровочную кривую, найти активность фактора IX.

В норме уровень фактора IX находится в диапазоне **50-150 %**.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Набор рассчитан на проведение **20-40 анализов** при расходе реагентов по 0,1-0,05 мл на одно определение.

Хранение набора должно проводиться при температуре +2... +8 °С в течение всего срока годности набора (**18 мес**). Допускается транспортировка при температуре до +25 °С в течение 30 сут. Замораживание не допускается.

Во вскрытом флаконе АПТВ-реагент должен находиться в течение рабочего дня при комнатной температуре, по окончании которого реагент следует хранить при температуре +2... +8 °С. Такое чередование температурного режима допускается до полного расходования объема АПТВ-реагента на протяжении 2 недель.

После вскрытия раствор кальция хлорида в герметично закрытом флаконе следует хранить при температуре +2... +8 °С. Необходимый для проведения исследований (на протяжении рабочего дня) объем раствора кальция хлорида необходимо отлить в отдельную пробирку или флакон, где этот раствор может храниться при температуре +37 °С в течение 4 ч или при комнатной температуре не более 1 дня. Не допускается сливание остатков этого раствора после прогрева во вскрытый герметично закрытый флакон с хранящимся при температуре +2... +8 °С раствором кальция хлорида. Во вскрытом флаконе раствор кальция хлорида может храниться до полного расходования на протяжении 2 недель.

Разведенную контрольную плазму можно использовать в течение 3 ч в условиях хранения при комнатной температуре (+18... +25 °С), возможно замораживание при температуре -16... -20 °С на срок до двух недель.

Разведенную дефицитную по фактору IX плазму можно использовать в течение 3 ч в условиях хранения при комнатной температуре (+18... +25 °С), возможно замораживание при температуре -16... -20 °С на срок до двух недель.

ЛИТЕРАТУРА

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.: ФорматТ, 2006. - 208 с.