

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМак»



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Наборы реагентов для лабораторной диагностики in-vitro
тромбофилии к анализатору автоматическому коагулологическому
моделей Severon-alpha и Severon-alpha TGA**

Производства "Technoclone GmbH", Австрия

Соответствует требованиям национальных стандартов

код ОКП: 93 9816

Наборы реагентов для лабораторной диагностики in-vitro тромбофилии к анализатору автоматическому коагулологическому моделей Ceveron-alpha и Ceveron-alpha TGA

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для количественного определения функциональной активности белков в человеческой плазме методом флуориметрии.

Набор **TECHNOTHROMBIN® TGA** является системой для определения генерации фермента во времени в обедненной (PPP), или обогащенной (PPR) тромбоцитами плазме при активации клоттингового каскада мицеллами отрицательно заряженных фосфолипидов, содержащих различные количества человеческого клеточного фактора и CaCl_2 . Набор может быть использован для мониторинга гемофилий при ингибитор шунтирующей терапии, для мониторинга антикоагулянтной терапии, для расчета величин МНО для пациентов и определения состояний при кровотечениях или тромбофилиях, а также активности циркулирующих микрочастиц. Эта широкая область применения возможно благодаря различной концентрации клеточных факторов и мониторингу всей кинетики генерации в процессе инициации, амплификации и полной регуляции образования. **TECHNOTHROMBIN® TGA** поэтому является универсальным исследовательским набором для анализа и мониторинга функции гемостатической системы.

ПРИНЦИП ТЕСТА

TECHNOTHROMBIN® TGA основан на мониторинге флуоресценции, генерируемой расщеплением флуорогенного субстрата за время активации каскада коагуляции различными концентрациями тканевого фактора и отрицательно заряженными фосфолипидами в плазме. Из изменения флуоресценции во времени может быть рассчитана концентрация активного фермента (нМ) в пробе с использованием соответствующей калибровочной кривой. Увеличение концентрации во времени затем позволяет рассчитать генерацию фермента в пробе и построить график таких величин в зависимости от времени для всего процесса свертывания. Это затем приводит к визуализации различных фаз образования сгустка.

СОСТАВ

Набор реагентов **TECHNOTHROMBIN® TGA** содержит:

- 1) TGA-субстрат - Флуорогенный субстрат,
- 2) TGA-буфер - раствор для разведения реакционной смеси,
- 3) TGA-калибратор активного фермента (например, тромбина),
- 4) TGA-реагент (LC) - Реагент с низкой концентрацией фосфолипидных мицелл,
- 5) TGA-реагент (HC) - Реагент с высокой концентрацией фосфолипидных мицелл,

- 5) TGA-реагент (HC) - Реагент с высокой концентрацией фосфолипидных мицелл,
 6) TGA- контроль – Контрольная плазма (лиофилизированная), с известной активностью определяемого фермента.

ПОТРЕБУЮТСЯ МАТЕРИАЛЫ (не входят в набор)

Пипетка

Дистиллированная вода

Микроплашка, предназначенная для измерения флуоресценции (мы рекомендуем NUNC Maxisorp REF 475515)

Флуориметр, ридер флуоресценции (формат 96 лунок), ~360 нм/~460 нм (возбуждение/эмиссия) с подходящим программным обеспечением для мониторинга изменений флуоресценции во времени. Для некоторых ридеров доступны адаптации, которые можно загрузить из www.technoclone.com.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- только для исследований
- Каждая единичная донорская плазма и каждый лот контролей тестируются и являются негативными по Hb_sAg, HIV 1/2 Ab и HCV Ab. Однако универсальные меры предосторожности (обработка всех материалов человеческого происхождения как потенциально инфицированных) должны соблюдаться.
- Ко всем пробам крови и плазмы и продуктам следует относиться как к потенциально инфицированным и обращаться с ними следует с соответствующей осторожностью, полностью соблюдая требования биобезопасности, а утилизировать аналогично больничным отходам.

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Срок годности, напечатанный на наклейках, применим к не вскрытым флаконам при +2 – 8°C.

Стабильность после растворения:

Реагент	Комн. Темп.* (20...25°C)	+2...8°C	-20°C
TGA substrate (SUB)	1 неделя	1 месяц	6 месяц.
TGA buffer (BUF)	8 часов	1 неделя	1 месяц
TGA thrombin calibrator (CAL)	8 часов	1 неделя	6 месяц.
TGA reagent B (RB), C Low (RCL), High (RCH), reagent D (RD)	8 часов	1 неделя	6 месяц.
TGA control 1 (C1)	4 часа	8 часов	1 месяц
TGA control 2 (C2)	4 часа	8 часов	1 месяц
TGA control 3 (C3)	4 часа	8 часов	1 месяц

Избегайте загрязнения микроорганизмами

Плазму следует замораживать только 1 раз; при хранении флаконы должны быть плотно закрыты.

*Комнатная температура

Стабильность материала пробы:

Материал	Комн. Темп.*	+2...8°C	-20°C
----------	--------------	----------	-------

пробы	(20...25°C)		
PPP, PRP и PFP плазма	2 часа	4 часа	1 месяц

Рекомендуется немедленное центрифугирование после отбора крови. В дальнейшем мы рекомендуем немедленную шоковую заморозку отцентрифугированных проб.

Внимание! Замороженные пробы должны храниться при постоянных условиях. Избегайте изменения температуры при хранении проб.

Перед транспортировкой мы рекомендуем отцентрифугировать и подготовить пробы.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА ПОДГОТОВКА ПРОБ

При исследовании плазм, отобранных на цитрат, набором TECHNOTHROMBIN® TGA мы рекомендуем пробирки СТАД, могут быть использованы в зависимости от специфических применений плазма обогащенная тромбоцитами, обедненная тромбоцитами, или без тромбоцитов.

Для отделения плазмы смешайте 9 частей венозной крови и 1 часть раствора цитрата натрия (0,11 ммоль/л) и центрифугируйте 15 минут при 2500g (соответствует DIN 58905)/

Из специальных требований подготовки других плазм может быть необходимо:

Для плазм, обогащенных тромбоцитами (PRP) центрифугировать 5 минут при 100g и осторожно пипетировать полученные PRP;

Для плазм, обедненных тромбоцитами (PPP) центрифугируйте PRP 10 минут при 1500g и осторожно пипетируйте полученные PPP.

Для плазм без тромбоцитов и микрочастиц (PFP) центрифугируйте PPP 30 минут при 15000g и осторожно пипетируйте полученные PFP, или используйте устройство Technoclonе для фильтрации микрочастиц.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Ллиофилизированные реагенты должны быть растворены в объеме дистиллированной воды, указанной на флаконе. Все растворенные реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием.

Через ровно 20 минут от начала растворения и тщательного перемешивания (Вортекс), реагенты готовы к использованию.

Для стандартизации тестов рекомендуется контроли выдерживать 30 минут после начала растворения.

УСТАНОВКА РИДЕРА

Используйте соответствующую адаптацию (reader application) на сайте www.technoclone.com.

Температура при измерении: 37°C

Длины волн флуориметра: ~360 нм/~460 нм (возбуждение/эмиссия).

Внимание! Чтобы избежать неожиданностей и неточностей при считывании проб, которые могут быть из-за неоднородности или дефектов плашки, рекомендуется вначале считать пустую плашку.

ВРЕМЯ СЧИТЫВАНИЯ

1. Калибровочная кривая: 10 минут с 30 секундным интервалом.

Калибровочная кривая должна делаться отдельно от измерения проб.

2. Пробы: в зависимости от материала пробы 60 минут (для терапии ингибитора фактора VIII 90 – 120 минут) с интервалом в 1 минуту.

ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕСТА

Пробы и растворенные реагенты должны быть доведены до комнатной температуры перед использованием.

Калибровочная кривая

Калибровочная кривая должна делаться отдельно от измерения проб. Концентрация калибратора (CAL) лот-специфична, смотрите наклейку на флаконе.

Калибратор разбавляется буфером TGA как указано в таблице ниже:

1-е разведение (1 : 2): (стандарт 1)	200 мкл Thrombi Calibrator (CAL) + 200 мкл TGA buffer (BUF)
2-е разведение (1 : 4): (стандарт 2)	100 мкл 1-го разведения +100 мкл TGA buffer (BUF)
3-е разведение (1 : 20) (стандарт 3)	20 мкл Thrombi Calibrator (CAL) +380 мкл TGA buffer (BUF)
4-е разведение (1 : 200) (стандарт 4)	20 мкл 3-го разведения +180 мкл TGA buffer (BUF)

Все калибраторы должны быть измерены в дублях.

Добавьте реагенты в следующей последовательности:

40 мкл	Разведения калибратора (стандарт 1 – стандарт 4) TGA substrate (SUB)
50 мкл	
Измерять 10 минут с 30 секундным интервалом при 37°C	

Начать считывание плашки/стрипа немедленно после пипетирования субстрата.

ДЛЯ КАЖДОГО ЛОТА ДОЛЖНА СТРОИТЬСЯ ТОЛЬКО ОДНА КАЛИБРОВОЧНАЯ КРИВАЯ

2.) Измерение проб

Реагенты должны добавляться в следующей последовательности:

Реагент	Измерение с		
	TGA RB TGA RC Low	TGA RC High	TGA RD *
проба	40 мкл	40 мкл	20 мкл
RB + RCL	10 мкл	-	-
RCH	-	10 мкл	-
TGA RD	-	-	30 мкл
TGA SUB	50 мкл	50 мкл	50 мкл
измерение 60 мин (для терапии FVIII ингибитора 90 - 120 мин) с интервалом измерения 1 минута при 37°C			

Начать считывание плашки немедленно после пипетирования субстрата.

Смесь субстрат-реагент может быть приготовлена заранее.

Приготовление смеси:

Смесь реагента и субстрата должна быть сделана в пропорции 1 + 5 для RC Low и RC High и 3 + 5 для RD.

Смесь следует разделить на аликвоты и заморозить при -20°C .

Когда используется смесь реагент/субстрат, реагенты должны быть добавлены в следующей последовательности:

Реагент	Измерения со смесью реагент/субстрат:		
	RB + RC Low	RC High	TGA RD*
проба	40 мкл	40 мкл	20 мкл
смесь реагент/субстрат	60 мкл	60 мкл	80 мкл
измерение 60 мин (для терапии FVIII ингибитора 90 - 120 мин) с интервалом измерения 1 минута при 37°C			

Начать считывание плашки немедленно после пипетирования субстрата.

Внимание! Мы рекомендуем измерять каждую пробу в дублях.

***ВНИМАНИЕ:** Отличие схемы пипетирования для реагента D

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обработка TECHNOTHROMBIN® TGA выполняется автоматически программой (программу для некоторых ридеров можно загрузить с сайта www.technoclone.com). Программа включает калибровочную кривую и обработку проб.

РАСЧЕТ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Используя предлагаемую программу, данные по относительным единицам флуоресценции (RFU), полученные флуориметром для разных концентраций, конвертируются в калибровочную кривую. Эта калибровочная кривая затем используется программой для расчета концентрации фермента в нМ в пробе, измеряемой в данный момент.

АНАЛИЗ ПРОБ

Предлагаемая программа (www.technoclone.com) рассчитывает генерацию активного фермента в пробе в зависимости от времени и результаты выводятся в нМ фермента, генерируемого в пробе, для каждой точки времени в течение всего процесса коагуляции. При инициации коагуляции в пробе добавлением CaCl_2 и смеси фосфолипид/тканевой фактор, генерирование фермента начинается после периода задержки: после этого генерация фермента поминутно возрастает, достигает максимума, после чего уменьшается. Рисунок выглядит похожим на показанный ниже:

Всего произведено
и пронумеровано
5 (пять) листов.
Генеральный
Директор
ЗАО "БиоХимМак"
Мякин Ч.С.

