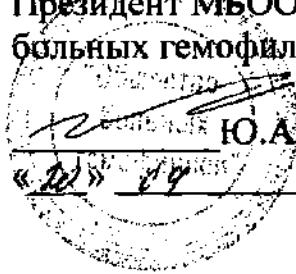


УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2009 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент МБООИ «Общество
больных гемофилией»


Ю.А. Жулев
«12» 12 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для определения активности
IX фактора свертывания крови
(Фактор IX-тест)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Фактор IX-тест предназначен для исследования активности IX фактора свертывания в плазме крови человека с целью диагностики гемофилии В и для контроля за достаточностью заместительной терапии при гемофилии В.

Один набор предназначен для проведения 20 определений при расходе по 0,05 мл каждого реагента на 1 анализ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Измерение активности ф. IX проводят в разведенном исследуемом образце. Для нивелирования возможного влияния на результаты исследования вариабельности факторов свертывания в инкубационную среду вносят субстратную плазму, в которой практически отсутствует (менее 2%) активность ф. IX, но сохранена активность всех других факторов свертывания. В такой системе продолжительность процесса свертывания зависит только от активности ф. IX в исследуемом образце, которую определяют по калибровочному графику. Калибровочный график зависимости времени свертывания, сек, от активности ф. IX, %, строят по разведенным растворам плазмы-калибратора с аттестованной по Международному стандарту активностью ф. IX.

2.2. Состав набора

- лиофильно высушенный эририд (аналог кефалина) - 1 флакон;
- суспензия каолина в 0,9% растворе натрия хлористого - 1 флакон (5,0 мл);
- 0,025 М раствор кальция хлористого - 1 флакон (5,0 мл);
- лиофильно высушенная субстратная плазма (активность фактора IX менее 2 %) - 1 флакон;



- лиофильно высушенная плазма-калибратор с аттестованной активностью фактора IX - 1 флакон;
- концентрат имидазолового буфера - 1 флакон (5,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Гемофилия В - сцепленное с полом заболевание, вызванное наследственным дефектом фактора IX - важного компонента средней фазы внутреннего каскада свертывания крови. Его роль в свертывании крови связана с активацией фактора X посредством взаимодействий с ионами кальция, фосфолипидами мембраны и фактором IX.

Для гена фактора IX характерна высокая частота возникновения мутаций -4,1-10 за поколение. Гемофилия В характеризуется спонтанными, нередко смертельными кровотечениями, кровоизлияниями в суставы, ведущими к ранней инвалидности. Уже при снижении дефицитного фактора до 30% (норма - 50-200%) заболевание проявляется в скрытой форме и обнаруживается после оперативных вмешательств в виде профузных кровотечений. Эти больные в течение всей жизни нуждаются в заместительной терапии препаратами плазмы.

Набор Фактор IX-тест предназначен для количественного исследования активности фактора IX в плазме крови человека по стандартному одностадийному методу. Метод основан на определении АЧТВ в разведенной плазме, к которой добавляется плазма больных гемофилией В, содержащая менее 2% активности фактора IX, но имеющая нормальную активность всех других факторов свертывания крови. Калибратором служит плазма-калибратор с аттестованным значением активности фактора IX, разведенная в 5, 10, 50 и 250 раз буферным раствором. Активность фактора IX выражается в % от нормы и в международных единицах (МЕ) активности.

Активность фактора IX в контрольной плазме - 80-110 % или 0,8-1,1 МЕ/мл.

Допустимое отклонение активности фактора IX в контрольной плазме от аттестованного значения - не более 10%.

Коэффициент вариации результатов определения - не более 10%.

Допустимый разброс результатов при определении активности фактора IX в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии - не более 10%.

Чувствительность определения - 1,5 %.

Линейность определяемых значений активности фактора IX в плазме крови человека в диапазоне разведений контрольной плазмы - от 2 до 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

4.2. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического

режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- Механический или оптико-механический коагулометр с набором пластиковых кювет;
- пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,05 и 1,0 мл;
- центрифуга лабораторная медицинская, позволяющая провести центрифугирование со скоростью 2000 g (3000 об/мин);
- мерная колба вместимостью 100 мл;
- пробирки центрифужные мерные стеклянные, силиконизированные или пластиковые;
- вода дистиллированная;
- 0,11 М раствор натрия лимоннокислого;
- бумага масштабнo-координатная полулогарифмическая;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Смешать в пластиковой (или стеклянной силиконизированной) центрифужной пробирке 9 частей свежесобранной венозной крови пациента с 1 частью 3,8% (0,11 М) раствора натрия лимоннокислого.

Центрифугировать в течение 15 мин при 3000 об/мин (2000 g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 1,0 мл плазмы.

Исследуемую плазму пациента допускается использовать для анализов не более 4 ч при комнатной температуре (18-25°C), не более 8 ч при температуре 2-8°C и не более 2 мес после однократного замораживания и хранения при температуре минус 18-20°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление реагентов

Рабочий буферный раствор

Буфер имидазоловый концентрированный (5,0 мл) перелить в мерную колбу вместимостью 100 мл и долить до метки дистиллированной водой (разведение в 20 раз), тщательно перемешать.

Рабочий буферный раствор хранить при температуре 2-8°C не более 1 мес.

Кефалин-каолиновая смесь

Внести во флакон с эрилидом (кефалином) суспензию каолина. Кефалин-каолиновая смесь готова к проведению анализа через 30 минут после добавления каолина. Перед проведением анализа встряхивать.

Плазма субстратная

Во флакон с субстратной плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Использовать через 20 минут после растворения.

Плазма-калибратор.

Во флакон с плазмой-калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Использовать через 20 минут после растворения.

Кальция хлорида 0,025 М раствор.

Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть температуре 37°C. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

7.2. Стабильность реагентов

Реагенты	2-8°C	18-25°C	минус 18-20°C
Кефалин-каолиновая смесь	14 сут	1 сут	2 мес
Раствор плазмы-калибратора	8 ч	4 ч	2 мес
Раствор плазмы субстратной	8 ч	4 ч	2 мес

7.3. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика плазму-калибратор с аттестованным значением активности ф. IX развести буферным раствором в 5, 10, 20, 40, 80 и 480 раз.

Порядок разведения указан в таблице 1.

Таблица 1. Схема разведения плазмы-калибратора для построения калибровочного графика.

Внести в пробирку	в 5 раз	в 10 раз	в 20 раз	в 40 раз	в 80 раз	в 480 раз
Активность фактора IX в плазме-калибраторе, %	A*	0,5 A	0,25 A	0,125 A	0,0625 A	0,01 A
Рабочий буферный раствор, мл	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Раствор плазмы-калибратора, мл	0,2	-	-	-	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	

*А – активность фактора IX в плазме-калибраторе, указанная в паспорте.

В каждом разведении определить время свертывания, сек, по методу, описанному ниже. Каждое определение повторить 2 раза, рассчитать среднюю арифметическую величину (Е, сек) по формуле (1):

$$E = \frac{\sum E_i}{n} \quad (1),$$

где:

- $\sum E_i$ - сумма результатов однократных измерений времени свертывания каждого разведения плазмы-калибратора, сек;
- n - число определений.

На полулогарифмической бумаге отложить:

- по вертикальной линейной оси ординат (Y) – продолжительность времени свертывания каждого разведения плазмы-калибратора, сек;
- по горизонтальной логарифмической оси абсцисс (X) - активность ф. IX, %.

При соединении нанесенных точек образуется прямая линия калибровочного графика, предназначенного для определения активности ф. IX в исследуемом образце плазмы крови пациента.

7.4. Ход исследования

Учитывая, что содержание ф. IX в исследуемой плазме пациента может быть, как низким (гемофилия), так и повышенным (тромбофилия), исследуемый образец плазмы пациента рекомендуется сначала развести рабочим буферным раствором в 5 раз и определить по калибровочному графику активность ф. IX по методу, описанному ниже. Если активность ф. IX более высокая и не удастся по графику определить активность, исследуемый образец следует развести в 10 или в 20 раз рабочим буферным раствором по схеме:

Активность ф. IX, %	Разведение в раз	Объем образца мл	Объем буфера мл	Кoeffициенты пересчета К
Меньше 50	5	0,1	0,4	1
От 50 до 150	10	0,1	0,9	2
Больше 150	20	0,1	1,9	4

Анализ провести в пластиковых кюветах или в силиконированных пробирках, термостатируемых при температуре 37°C.

Внести в кювету анализатора или пробирку:	Объем
Одно из разведений плазмы-калибратора (или исследуемый образец плазмы пациента)	0,05 мл
Раствор плазмы субстратной	0,05 мл
Кефалин-каолиновая смесь	0,05 мл
Инкубировать при температуре 37°C точно 3 мин	
Кальция хлорида 0,025 М раствор	0,05 мл

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрируется время свертывания, сек, от момента добавления кальция хлористого до момента образования сгустка фибрина.

Активность ф. IX определить по калибровочному графику, %. Полученное значение следует умножить на коэффициент К, соответствующий разведению исследуемого образца плазмы пациента.

Если значение активности ф. IX в двух последовательных разведениях различается не более, чем на 10%, то за истинное значение активности принимают среднюю арифметическую величину между этими двумя измерениями.

Для пересчета в единицы МЕ/мл полученное значение активности ф. IX, %, нужно разделить на 100.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Гемофилия тяжелой степени. Уровень ф. IX менее 1%. Кровоизлияния в суставы, мышцы и другие органы случаются при минимальных или даже незаметных повреждениях.

Гемофилия средней степени. Уровень ф. IX между 1-5%. Кровотечения возникают из-за явных незначительных повреждений, также после различных операций и удалений зубов.

Гемофилия легкой степени. Уровень ф. IX между 6-30%. Кровоизлияния обычно следуют только за крупными повреждениями, хирургическими операциями или удалением зубов. Такая форма может быть не диагностирована до взрослого возраста или до проявления кровотечений после указанных ситуаций.

Тромбофилия. Уровень фактора IX превышает 200%.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Хранение набора должно проводиться при температуре 2-8° С в течение всего срока годности набора (12 мес). Допускается хранение при температуре до 25° С в течение 10 сут. Замораживание не допускается.

Раствор кефалин-каолиновой смеси можно использовать для исследований в течение 1 сут при комнатной температуре, 14 сут при температуре 2-8° С и 2 мес в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°С.

После вскрытия флакона с раствором кальция хлористого последний может быть использован повторно при условии достаточной герметизации флакона. Раствор кальция хлористого, который подвергался прогреву при проведении тестов, повторному использованию не подлежит.

Исследуемую плазму пациента допускается использовать для анализов не более 4 ч при комнатной температуре (18-25°С), не более 8 ч при температуре 2-8°С и не более 2 мес после однократного замораживания и хранения при температуре минус 18-20°С.

Раствор имидазолового буфера можно хранить при температуре 2-8° С не более 1 мес.

Раствор субстратной плазмы и плазмы-калибратора после реконституции можно хранить не более 4 ч при комнатной температуре, не более 8 ч при температуре 2-8°С и не более 2 мес после замораживания и хранения при температуре минус 18-20°С.

Калибровочный график необходимо строить ежедневно.

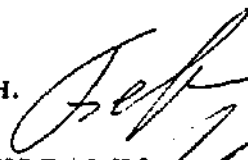
1 набор рассчитан на проведение 20 определений при расходе каждого реагента по 0,05 мл на 1 анализ.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

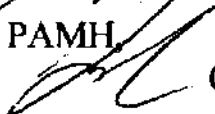
По вопросам, касающимся качества набора Фактор IX-тест, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а, телефон/факс (495) 614-9057, e-mail: renam@blood.ru

и в Лабораторный Центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117241, г. Москва, Научный проезд, д.14 а, тел.: 8-499-120-60-96.

Зав. производства НПО «РЕНАМ» к.б.н.

 А.Л.Берковский

Зав. лаб. клинической коагулологии ГНЦ РАМН,
д. м. н., профессор

 С.А.Васильев

