

**ИНСТРУКЦИЯ**

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения активности фактора IX свертывания крови (Фактор IX-тест) по ТУ 9398-021-05595541-2009»

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения активности фактора IX свертывания крови (Фактор IX-тест) по ТУ 9398-020-05595541-2009» (далее по тексту – Фактор IX-тест) предназначено для определения активности фактора IX (ф. IX) свертывания крови в плазме крови пациентов и в препаратах фактора IX одностадийным клоттинговым методом с целью диагностики гемофилии В, тромбофилии и определения качества препаратов фактора IX. Фактор IX-тест предназначен для работы ручным методом, а также на автоматических и полуавтоматических коагулометрах, способных регистрировать образование сгустка в присутствии каолина.

**ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА****Состав набора**

Эрилит, лиофильно высушенный аналог кефалина, - 1 флакон;  
Каолин, суспензия в 0,9%-ом растворе натрия хлористого - 5,0 мл/флакон - 1 флакон;  
0,025М раствор кальция хлористого - 5,0 мл/флакон - 1 флакон  
Плазма субстратная IX, лиофильно высушенная 1,0 мл/флакон - 1 флакон;  
Плазма-калибратор лиофильно высушенная 1,0 мл/флакон - 1 флакон;  
Буфер имидазольный концентрированный - 5,0 мл/флакон - 1 флакон.

**Число анализируемых проб биологического материала**

Один набор предназначен для проведения 20 анализов при расходе 50 мкл реагента на один анализ.

**Принцип метода.**

При добавлении к разведенной исследуемой плазме субстратной дефицитной плазмы происходит коррекция всех факторов свертывания кроме ф. IX. Поэтому время свертывания в тесте АЧТВ смеси разведенной исследуемой и субстратной дефицитной по ф. IX плазм зависит только от активности ф. IX в исследуемой плазме. Активность ф. IX определяют по калибровочному графику разведений плазмы-калибратора с установленной активностью ф. IX.

**МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ КАЛИБРАТОРУ**

Активность ф. IX в плазме-калибраторе устанавливают при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против пула донорской плазмы, взятой от не менее 100 здоровых доноров обоего пола, активность фактора IX в котором принята за 100%. Значения активности ф. IX в плазме-калибраторе указано в паспорте медицинского изделия.

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****Специфичность**

Следующие вещества не влияют на правильность определения активности ф. IX: билирубин в концентрации до 0,6 г/л, свободный гемоглобин – до 5 г/л, триглицериды – до 6 г/л и нефракционированный гепарин – до 1 МЕ/мл. При превышении указанных концентраций возможно получение ложно заниженных результатов.

**Воспроизводимость**

Коэффициент вариации результатов определения активности ф. IX не превышает 10%. Межфлаконная вариация определения активности ф. IX не превышает 10%.

**Точность**

Допустимое отклонение от аттестованного значения при определении активности ф. IX в контрольной плазме не превышает 10%.

**Линейность**

В тесте на «линейность» в диапазоне от 100 до 1% отклонение не более 10%.

**Продолжительность АЧТВ**

Продолжительность АЧТВ в Плазме субстратной IX должна составлять не менее 80 - 150 секунд, в зависимости от используемого АЧТВ-реагента.

**Чувствительность**

Чувствительность определения ф. IX не более 2%.

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Набор Фактор IX-тест предназначен для диагностики *in vitro*. Медицинское изделие (МИ) Набор Фактор IX-тест относится к классу потенциального риска применения 2а, так как это МИ с измерительной функцией, с нефиксированным перечнем выполняемых лабораторных исследований, при применении которого терапевтическое решение должно приниматься после проведения дальнейших исследований, это МИ с умеренным индивидуальным риском и низким риском для общественного здоровья (Приложение 2 к Приказу МЗ № 4н от 6 июня 2012 г.).

⚠ В состав реагентов набора входит азид натрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводной системы с образованием потенциально взрывоопасных азидов металлов. В маркировку МИ внесен специальный знак предупреждения.

При работе с реагентом следует соблюдать правила, описанные в следующих документах: «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010); Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика ВИЧ-инфекции» (СП 3.1.5. 2826 от 11.01.2011).

⚠ При работе с исследуемыми образцами крови пациентов следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, т.к. 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**

Коагулометр, способный регистрировать образование сгустка в присутствии каолина с набором пластиковых кювет;

- центрифуга лабораторная;
- секундомер (для ручного метода);
- термобаня, поддерживающая температуру плюс 37°C (для ручного метода);
- 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;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага масштабно-координатная полулогарифмическая.

**АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ****Вид анализируемого биологического материала**

Набор Фактор IX-тест предназначен для определения активности ф. IX в венозной плазме крови человека, в СЗП и в лечебных препаратах криопреципитата.

Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов, не должны контактировать со стекляннной поверхностью.

Образцы СЗП и криопреципитата должны иметь вид прозрачной жидкости желтоватого цвета.

**Процедура получения биологического материала****Получение плазмы венозной крови**

Венозную кровь отобрать в пластиковую пробирку с 3,8% (0,109 моль/л) цитратом натрия в соотношении 9:1 или в вакуумные системы для взятия крови с 3,2% (0,109 моль/л) цитратом натрия, центрифугировать при комнатной температуре плюс (18-25)°C в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g). Плазму крови непосредственно после получения или анализируют сразу по методу, описанному ниже, или помещают во флаконы с плотно закрывающимися крышками, замораживают и хранят при температуре не выше минус 20°C. При таких условиях образцы пригодны для анализа в течение 2 месяцев.

**Условия хранения биологического материала**

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20°C и хранении при этой температуре не более 2 мес.

Растворы СЗП и криопреципитата хранению не подлежат.

**Ограничения по использованию биологического материала**

При работе с кровью общим правилом является немедленное отделение плазмы от форменных элементов, так как некоторые вещества могут поглощаться и инактивироваться эритроцитами и лейкоцитами.

Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Рабочий буферный раствор.** Буфер имидазольный концентрированный развести в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерный цилиндр, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать).

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

**Плазма субстратная IX.** Во флакон с Плазмой субстратной IX внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Время растворения реагента в дистиллированной воде при комнатной температуре плюс (18-25°C) составляет не более трех минут.

Использовать через 20 минут после растворения.

**Плазма-калибратор.** Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 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 при 37°C. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

**ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ****Проведение анализа на автоматическом коагулометре**

- Выбрать на коагулометре программу для определения активности фактора IX одностадийным клоттинговым методом;
- поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра;
- запустить программу построения калибровочной прямой (для каждой новой серии реагентов);
- поместить контрольные и исследуемые образцы плазмы в соответствующие ячейки коагулометра;
- запустить программу измерения;
- считать результаты.

## Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре и ручным методом Построение калибровочного графика

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить следующие разведения Плазмы-калибратора:

Пробирка, №	1	2	3	4	5	6
Активность фактора IX в Плазме-калибраторе, %	A*	0,5A	0,25A	0,125A	0,0625A	0,01A
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						

\*A – активность фактора IX в Плазме-калибраторе, указанная в паспорте на набор.

Во всех разведениях Плазмы-калибратора провести определение времени свертывания, сек, по методу, описанному ниже, и внести в память полуавтоматического коагулометра для построения калибровочного графика.

Для ручного метода на масштабно-координатной полулогарифмической бумаге построить калибровочный график зависимости времени свертывания, сек, (ось Y) от активности ф. IX, % (ось X) в Плазме-калибраторе. График должен представлять собой прямую линию.

Калибровочный график также можно построить, используя программу Microsoft Excel.

### Подготовка исследуемых образцов для анализа

#### Приготовление плазмы пациента

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 удается по графику определить активность, исследуемый образец следует развести в 10 или в 20 раз рабочим буферным раствором по схеме:

Ожидаемая активность ф IX в %	Разведение в раз	Объем плазмы мл	Объем буфера мл	Коэффициент К
Больше 150	20	0.1	1.9	4
От 50 до 150	10	0.1	0.9	2
Меньше 50	5	0.1	0.4	1

#### Приготовление образца препарата фактора IX

Препарат фактора IX развести и проанализировать согласно фармакопейной статье на препарат.

#### Проведение анализа

Внести в кювету анализатора или пробирку:	Объем
Одно из разведений плазмы-калибратора (исследуемой)	50мкл
Раствор плазмы субстратной дефицитной	50мкл
Кефалин-каолиновая смесь	50мкл
Инкубировать при 37°C, точно 3 минуты.	
Кальция хлорида 0,025 М раствор	50 мкл

#### РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Регистрируют время от момента добавления кальция хлорида до момента образования сгустка.

Для полуавтоматических или автоматических коагулологических анализаторов следует воспользоваться программой Фактор IX-тест соответствующего анализатора.

Для ручного метода, используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца, определить активность ф. IX. Полученное значение следует умножить на коэффициент разведения К, соответствующий разведению исследуемого образца.

#### Интерпретация результатов

За единицу активности принимается активность фактора IX, содержащегося в пуле донорской плазмы, взятой не менее чем от 300 здоровых доноров мужчин. Активность фактора IX выражается в международных единицах (МЕ) или в процентах, причем 1МЕ/мл соответствует 100% активности.

#### Уровень активности фактора IX в плазме в норме и патологии.

Активность фактора IX в %	Заболевание
Больше 150	Почечная недостаточность Диабет Тромбофилическое состояние Прием гормональных контрацептивов
От 50 до 150	Норма
От 25 до 49	Гемофилия В, скрытая форма
От 5 до 24	Гемофилия В, легкая форма
От 1 до 5	Гемофилия В средней тяжести
Меньше 1	Гемофилия В, тяжелая форма

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности фактора IX в плазме пациентов следует контролировать с помощью Плазмы контрольной, код КМ-2.

Мультикалибратор, код КМ-16 может быть использован для построения калибровочного графика.

#### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора Фактор IX-тест – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде при температуре плюс (2-8)°C.

Растворенные реагент следует хранить в плотно укупоренном состоянии

#### Стабильность приготовленных реагентов

Реагенты	+2-8°C	+18-25°C	-18-20°C
Кефалин-каолиновая смесь	14 суток	1 сутки	2 месяца
Раствор плазмы-калибратора	8 часов	4 часа	2 месяца
Раствор плазмы субстратной дефицитной	8 часов	4 часа	2 месяца

Раствор кальция хлорида стабилен при комнатной температуре в течение всего срока хранения.

Оттаивать замороженные реагенты следует при температуре плюс 37°C. Оттаявшие реагенты следует использовать в течение 2 ч.

Транспортирование набора Фактор IX-тест должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре плюс 2-8°C.

Допускается транспортирование и хранение набора при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

#### МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором Фактор IX-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. Обеззараживание и утилизация поступивших реагентов происходит на специально оборудованных площадках в соответствии с требованиями, предусмотренными существующими Федеральными законами и с соблюдением обязательных требований по охране окружающей среды.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов «Плазма субстратная IX», 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.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М., «НьюДиамед», 2001 - 285 с.
- Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. ФЭН, Казань, 2000. - 360 с.
- Г.А.Яровая, Е.А.Нешкова, А.Л.Берковский, Е.В.Сергеева, А.В.Суворов, А.Л.Мелкумян. Внутренний путь свертывания крови : учебно-методическое пособие - М.: ФГБОУ ДПО РМАПО, 2017. – 83 с.
- Turi DC, and Peerschke EI. Sensitivity of Three Activated Partial Thromboplastin Time Reagents to Coagulation Factor Deficiencies. Am J. Clin. Pathol. 1986; 85:43-49.

#### СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

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

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125167, г. Москва, Нарышкинская аллея, д. 5, стр. 2.  
тел./факс (499) 707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: [info@renam.ru](mailto:info@renam.ru).