

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 9398-021-05595541-2009» (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

Эририд, 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 указаны 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*. Класс потенциального риска применения набора - 2а.

Набор реагентов АЧТВ-тест не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляет рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

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).

⚠ 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 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 масштабнo-координатная полулогарифмическая.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

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

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

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).

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 хранение при этой температуре не более 2 месяцев.

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 эрилидом (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 от плюс 18 до плюс 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 плюс 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		0,5	0,5	0,5	0,5	0,1

*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 от плюс 2 до плюс 8°C.

Растворенные реагенты 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 от плюс 2 до плюс 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 «Фактор IX-тест», 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:

125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 4, стр. 2.
тел/факс (499)707-76-30, (495) 225-12-61, e-mail: info@renam.ru