УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 22 сентября 2011г.
№ 6120-Пр/11

УТВЕРЖДАЮ
Директор ООО фирма
«Технология-Стандарт»
_____ А.П. Момот
«8» июня 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения активности фактора IX в плазме крови (Тех-Фактор IX-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Тех-Фактор IX-тест предназначен для определения активности фактора IX в плазме крови человека при использовании коагулометров разных конструкций. Определение активности фактора IX применяется для диагностики гемофилии В и для контроля заместительной терапии больных гемофилией В концентратами коагуляционного фактора IX.

Набор рассчитан на проведение 20 анализов при расходе по 0,1 мл раствора АПТВ-реагента на 1 анализ.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Принцип метода. Определяется время свертывания разведенной 1:5 плазмы крови человека в смеси с дефицитной по фактору IX плазмой и АПТВ-реагентом, в присутствии ионов кальция. Время свертывания разведенной плазмы пропорционально активности фактора IX, которую определяют по калибровочному графику разведений контрольной плазмы с установленным содержанием фактора IX.

СОСТАВ НАБОРА:

1. Дефицитная по фактору IX плазма (лиофильно высушенная дефицитная по фактору IX плазма крови человека) - 1 фл.
2. Контрольная плазма (лиофильно высушенная контрольная плазма крови человека с установленной активностью фактора IX) - 1 фл.
3. АПТВ-реагент (смесь, содержащая фосфолипиды мозга кролика, эллаговую кислоту, буфер и стабилизаторы) - 1 фл.
4. Буфер трис-HCl, концентрированный, 1 М - 1 фл.
5. Кальция хлорид, 0,025 М раствор – 1 фл.

Составлена: Директором ООО фирмы «Технология-Стандарт» д.м.н., проф. А.П. Момотом и зам. директора к.м.н., доц. И.И. Шахматовым

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Набор обеспечивает линейность определения активности фактора IX в плазме крови в диапазоне от 2 до 100 %, отклонение от "линейности" – не более 10 %.

Чувствительность определения – не более 1 %.

Коэффициент вариации результатов определения активности фактора IX в плазме крови не превышает 10 %.

Нормальные величины активности фактора IX в плазме крови человека составляют 50-150 %.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2 а.

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 или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ:

- Коагулометр с блоком пробоподготовки и кюветами;
- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 3000 об./мин (1200 g);
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкостей 0,1 мл; 0,2 мл; 1,0 мл; 5,0 мл;
- пробирки стеклянные вместимостью 5,0-10,0 мл;
- мерный цилиндр вместимостью 200 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Кровь для исследования забирают из локтевой вены в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% раствор натрия лимоннокислого 3-замещенного (цитрата натрия), соотношение объемов крови и цитрата натрия – 9:1. Кровь центрифугируют при 1000 об./мин (240 g) при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 7 мин. Богатую тромбоцитами плазму переносят в другую пробирку и повторно центрифугируют при 3000 об./мин (1200 g) при комнатной температуре в течение 15 мин.

Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование - сразу после завершения повторного центрифугирования. Не допускается анализ плазмы крови, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 ч назад, а также замороженной плазмы крови.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ К РАБОТЕ

А. 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 (18-25 °С) и легком покачивании в течение 3 мин. В результате получают разведенную дефицитную по фактору IX плазму. Перед использованием разведенную дефицитную по фактору IX плазму следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 15 мин.

Разведенную дефицитную по фактору IX плазму можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч.

Б. Разведение контрольной плазмы

Во флакон с контрольной плазмой внести 1,0 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре и легком покачивании в течение 3 мин. В результате получают разведенную контрольную плазму. Перед использованием разведенную контрольную плазму следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 15 мин.

Контрольную плазму следует разводить в день начала проведения определения и использовать для построения калибровочной кривой.

Разведенную контрольную плазму можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч.

Активность фактора IX в контрольной плазме указана в паспорте на набор.

В. Разведение концентрированного буфера трис-HCl

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

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 недель.

Г. Разведение АПТВ-реагента

Набор Тех-Фактор IX-тест может поставляться в двух видах комплектации – с жидким АПТВ-реагентом, готовым к использованию, и с лиофилизированным АПТВ-реагентом, требующим растворения в дистиллированной воде.

Во флакон с лиофильно высушенным АПТВ-реагентом внести 2,5 мл дистиллированной воды и растворить содержимое при комнатной температуре в течение 3 мин. Перед использованием разведенный АПТВ-реагент должен быть выдержан при комнатной температуре в течение времени не менее 15 мин.

Разведенный АПТВ-реагент можно хранить при комнатной температуре не более 2 дней.

Жидкий АПТВ-реагент готов к применению и не требует каких-либо разведений. Перед проведением исследований флакон с жидким АПТВ-реагентом необходимо встряхнуть и выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 15 мин.

Д. Другие реагенты

Кальция хлорид готов к применению и не требует разведения. Перед использованием кальция хлорид следует прогреть при температуре 37 °С в течение времени не менее 15 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

2.1. Построение калибровочного графика

2.1.1. Приготовление калибровочных растворов контрольной плазмы.

Для получения калибровочного раствора № 1 в пробирке вместимостью 5,0-10,0 мл смешать при комнатной температуре 0,2 мл разведенной контрольной плазмы и 0,8 мл рабочего раствора буфера (разведение 1:5).

Для получения калибровочного раствора № 2 в пробирке вместимостью 5,0-10,0 мл смешать при комнатной температуре 0,1 мл разведенной контрольной плазмы и 0,9 мл рабочего раствора буфера (разведение 1:10).

Для получения калибровочного раствора № 3 в пробирке вместимостью 5,0-10,0 мл смешать при комнатной температуре 0,1 мл разведенной контрольной плазмы и 4,9 мл рабочего раствора буфера (разведение 1:50).

В качестве калибровочного раствора № 4 использовать рабочий раствор буфера.

2.1.2. Определение времени свертывания калибровочных растворов контрольной плазмы.

В кювету коагулометра внести 0,1 мл одного из калибровочных растворов контрольной плазмы.

Добавить в кювету 0,1 мл разведенной дефицитной по фактору IX плазмы и инкубировать в течение 1 мин в блоке пробоподготовки коагулометра при температуре 37 °С.

Добавить в кювету 0,1 мл АПТВ-реагента и инкубировать смесь в течение 3 мин при температуре 37 °С.

Добавить 0,1 мл раствора кальция хлорида, предварительно нагретого до температуры 37 °С, и включить таймер коагулометра. Отметить время свертывания (образования фибрина).

Определить время свертывания во всех калибровочных растворах контрольной плазмы.

2.1.3. Построение калибровочного графика.

Построить на билогарифмической бумаге калибровочный график, где на оси ординат отметить время свертывания в сек, а на оси абсцисс – активность фактора IX в приготовленных калибровочных растворах.

2.2. Определение активности фактора IX.

2.2.1. Разведение исследуемой плазмы крови.

В пробирке вместимостью 5,0-10,0 мл смешать при комнатной температуре (18-25 °С) 0,2 мл анализируемой плазмы крови и 0,8 мл рабочего раствора буфера (разведение 1:5).

2.2.2. Определение времени свертывания разведенной плазмы.

В кювету коагулометра внести 0,1 мл разведенной исследуемой плазмы.

Добавить в кювету 0,1 мл разведенной дефицитной по фактору IX плазмы и инкубировать в течение 1 мин в блоке пробоподготовки коагулометра при температуре 37 °С.

Добавить в кювету 0,1 мл АПТВ-реагента и инкубировать смесь в течение 3 мин при температуре 37 ° С.

Добавить 0,1 мл раствора кальция хлорида, предварительно прогретого до температуры 37 ° С, и включить таймер коагулометра. Отметить время свертывания (образования фибрина).

Примечание. Для коагулометров различного типа исследование выполняют в соответствии с инструкцией на коагулометр.

По калибровочному графику определить активность фактора IX в исследуемых образцах плазмы крови.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

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

Разведенную дефицитную по фактору IX плазму можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч; не замораживать.

Разведенную контрольную плазму можно хранить при комнатной температуре (18-25 °С) не более 3 ч; не замораживать.

Разведенный АПТВ-реагент можно хранить при комнатной температуре не более 2 дней или при температуре 2-8 °С не более 2 недель; не замораживать.

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

Концентрированный раствор буфера трис-HCl после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 недель.

Рабочий раствор буфера можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 недель.

Во вскрытом (но герметично закрываемом) флаконе раствор кальция хлорида можно хранить при температуре 2-8 °С до полного расходования реагента на протяжении 2 недель.

Не допускается сливание остатков рабочего раствора хлорида кальция после дня работы с герметично закрытым и хранящимся при температуре 2-8 °С раствором.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов Тех-Фактор IX-тест, следует обращаться в:

1. ООО фирму «Технология-Стандарт» по адресу: 656037, г. Барнаул, а/я 1351; тел.: (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39 или

2. Испытательный лабораторный центр ФГУ «НИИ ФХМ» ФМБА России по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а; тел.: (499) 246-44-01; 246-44-09.

Директор ООО фирма
«Технология-Стандарт» д.м.н., проф. _____ А.П. Момот

Зам. директора ООО фирма
«Технология-Стандарт» к.м.н., доц. _____ И.И. Шахматов

Мед. испытания проведены:
Главный врач НУЗ Отделенческая
клиническая больница на ст. Барнаул
ОАО «РЖД» к.м.н. _____ А.Г. Зальцман

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru