



## Набор реагентов для определения активности фактора IX свертывания крови.

Коагуляционный фактор IX – это витамин К-зависимый плазменный белок, состоящий из 415 аминокислот, разделенных на 5 полипептидных цепей. Активированный фактор IX участвует в активации фактора X в присутствии ионов кальция, анионных фосфолипидных мембран и ко-фактора VIIIa. Дефицит фактора IX является причиной гемофилии В – одного из наиболее распространенных врожденных заболеваний, проявляющихся кровотечением.

### Область применения.

Набор предназначен для измерения активности фактора IX в:

- в плазме доноров;
- в плазме больных гемофилией В;
- в плазме больных с ингибиторной формой гемофилии В;
- в плазме больных с тромбофилическими состояниями, обусловленными высоким уровнем активности фактора IX.

### Принцип метода.

Время свертывания в тесте АЧТВ смеси разведенной исследуемой и субстрат дефицитной по фактору IX плазм зависит только от активности фактора IX в исследуемой плазме. При добавлении к разведенной исследуемой плазме субстрат дефицитной плазмы происходит коррекция всех факторов свертывания кроме фактора IX.

### Состав набора.

1. Эрилид (кефалин) (1мл) – 1 флакон,
2. Каолин 0,5% суспензия (5мл) – 1 флакон,
3. Кальция хлорида 0,025М раствор (5мл) - 1 флакон,
4. Буфер имидазоловый концентрированный (5мл) – 1 флакон,
5. Плазма субстрат дефицитная по фактору IX (1мл) – 1 флакон,
6. Плазма-калибратор (1мл) – 1 флакон.

### Приготовление реагентов.

**Рабочий буферный раствор.** Буфер имидазоловый концентрированный (5 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<sup>0</sup>С не более 1 месяца.

**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 субстрат дефицитная по фактору IX.** Во флакон с субстрат дефицитной плазмой внести 1 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. 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.

### Стабильность реагентов.

Реагенты	+2-8 <sup>0</sup> С	+18-22 <sup>0</sup> С	-18-20 <sup>0</sup> С
Кефалин-каолиновая смесь	14 дней	2 дня	2 мес.
Раствор плазмы-калибратора	8 часов	4 часа	2 мес.
Раствор плазмы субстрат дефицитной	8 часов	4 часа	2 мес.

**Кальция хлорида 0,025 М раствор.** Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть при 37<sup>0</sup>С. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

### Стабильность.

+18-22 <sup>0</sup> С	+2-8 <sup>0</sup> С	+37 <sup>0</sup> С
До окончания срока хранения в закрытом виде		8 часов

### Получение исследуемой плазмы для анализа.

Венозную кровь взять в силиконированную стеклянную или пластиковую пробирку на 3,8% (0.11моль/л) цитрате натрия (9:1). Центрифугировать 7 мин при 1000 об/мин (240g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин (1200g). Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после центрифугирования перенести плазму в пластиковую пробирку. Для анализов достаточно 1,0 мл бедной тромбоцитами плазмы. Время хранения при комнатной температуре - не более 4 часов, при 2 - 8<sup>0</sup>С не более 8 часов. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре - 20<sup>0</sup>С.

### Построение и использование калибровочного графика.

Использовать только пластиковые или силиконированные стеклянные 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.

Значения активности фактора IX в % отложить на оси X. На оси Y отложить значения времени свертывания каждого разведенного образца плазмы-калибратора в секундах. Через полученные точки провести калибровочный график, который в полулогарифмических координатах должен представлять собой прямую линию. Линейность в диапазоне активности фактора IX от 1 до 100%.

### Проведение анализа.

- Непосредственно перед проведением анализа развести исследуемую плазму рабочим буферным раствором по следующей схеме:

Активность фактора 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

- Конечную точку свертывания фиксируют с помощью коагулометра или визуально. Анализ проводится в пластиковых пробирках, термостатируемых при 37<sup>0</sup>С.

Внести в кювету анализатора или пробирку:	Объем
Одно из разведений плазмы-калибратора (исследуемой)	50мкл
Раствор плазмы субстрат дефицитной	50мкл
Кефалин-каолиновая смесь	50мкл
Инкубировать при 37 <sup>0</sup> С, точно 3 минуты.	
Кальция хлорида 0,025М раствор	50 мкл
Зафиксировать время свертывания на таймере коагулометра, или с помощью секундамера.	

Используя калибровочный график и значение времени свертывания исследуемого образца определить активность фактора IX. Полученное значение следует умножить на коэффициент К, соответствующий разведению исследуемого образца.

### Интерпретация результатов.

Таблица 1. Уровень активности фактора IX в плазме в норме и патологии.

Активность фактора IX в %	Заболевание
Больше 200	Почечная недостаточность Тромбофилическое состояние Прием гормональных контрацептивов
От 50 до 200	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

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.

### Меры предосторожности.

Все компоненты данного набора предназначены только для диагностики in vitro. Компоненты набора следует рассматривать, как потенциально биологически опасные вещества, при работе с которыми необходимо соблюдать все меры предосторожности.

При работе с исследуемыми образцами следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита ВИЧ1 и ВИЧ2, гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

### Контроль качества.

Нормальные и патологические значения активности фактора IX следует контролировать с помощью контрольных плазм НПО РЕНАМ:

Плазма контрольная на 11 параметров

код КМ-2

*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](mailto:info@renam.ru)*