ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для определения активности фактора Виллебранда в плазме крови (Виллебранд-тест)

НАЗНАЧЕНИЕ
Фактор Виллебранда циркулирует в крови в виде комплекса с VIII фактором свертывания и обеспечивает взаимодействие тромбоцитов с поврежденной поверхностью сосудов. Снижение содержания этого фактора в плазме крови или отсутствие у него биологической активности является основной причиной болезни Виллебранда, поэтому определение его активности является одним из важных диагностических тестов.
Набор реагентов предназначен для работы на оптических агрегометрах и агглютинационным методом.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА
Состав набора
Фиксированные человеческие тромбоциты – 2 флакона.
Ристомицин – 2 флакона.
Плазма-калибратор (1мл) – 1 флакон.
Буфер концентрат (5мл) – 1 флакон.

Число анализируемых проб биологического материала
Один набор предназначен для проведения 40 анализов на агрегометре при расходе 50 мкл ристомицина на один анализ или 40 анализов вручную при расходе 50 мкл смеси фиксированных тромбоцитов с ристомицином на один анализ.

Принцип метода
Метод определения активности фактора Виллебранда основан на его способности вызывать агглютинацию тромбоцитов в присутствии антибиотика ристоцетина (ристомицина). Способность к такой агглютинации сохраняется у тромбоцитов после их фиксации формальдегидом, когда полностью утрачивается реакция на другие индукторы агрегации.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Специфичность
Следующие вещества не влияют на определение активности фактора Виллебранда набором Виллебранд-тест:
- билирубин в концентрации до 0,5 г/л;
- гемоглобин (свободный) – до 5 г/л;
- триглицериды – до 6 г/л;

Искажение результатов определения активности фактора Виллебранда может наблюдаться при беременности, введении коммерческих плазматических препаратов фактора VIII и вазопрессина.

Чувствительность
Виллебранд-тест позволяет определять активность фактора Виллебранда до 10%.

Воспроизводимость
Коэффициент вариации результатов определения активности фактора Виллебранда в одной пробе плазмы одним набором не превышает 10%. Коэффициент вариации результатов определения активности фактора Виллебранда в одной пробе плазмы разными наборами одной серии не превышает 10 %.

Линейность
Линейность определения от 10 до 100%.
Допустимое отклонение активности фактора Виллебранда в плазме-калибраторе от аттестованного значения не более 10%. Точное значения активности фактора Виллебранда в плазме-калибраторе устанавливают при аттестации каждой серии и указывают в паспорте.
В норме активность фактора Виллебранда составляет 70 – 150%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
Набор реагентов предназначен для диагностики in vitro. Класс опасности 2а. При работе с набором реагентов следует соблюдать правила, описанные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Инструкция утверждена Минздравом СССР в 1991 г.).
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, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ
- Агрегометр оптический с набором кювет;
- предметное стекло;
- настольная лампа;
- увеличительное стекло;
- секундомер;
- центрифуга лабораторная;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл
- 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);
- вода дистиллированная;
- мерный цилиндр;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ
Вид анализируемого биологического материала
Набор реагентов Виллебранд-тест предназначен для определения активности фактора Виллебранда в плазме человеческой крови.

Процедура получения биологического материала
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 (18-25°С) в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).
Пробы плазмы для анализа не должны быть гемолизованы, содержать сгустки и примесь эритроцитов.

Условия хранения биологического материала
Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 ч при комнатной температуре и не более 8 ч при температуре 2-8°С. Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 18-20^{0}С и хранение при этой температуре не более 2 мес.

Ограничения по использованию биологического материала
При работе с кровью необходимо немедленное отделение плазмы от форменных элементов, так как некоторые вещества могут поглощаться и инактивироваться эритроцитами, лейкоцитами и тромбоцитами.
Повторное замораживание образцов исследуемой плазмы не допускается, т.к. при повторном замораживании и оттаивании происходит частичная деградация белковых веществ.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
Рабочий буферный раствор. Буфер концентрированный (5 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (1:19). Рабочий буферный раствор должен иметь pH=7,40±0,05. Готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Ристомицин. Во флакон с ристомицином внести 1 мл дистиллированной воды, при осторожном покачивании перемешать. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Раствор плазмы-калибратора. Во флакон с плазмой-калибратором внести 1 мл дистиллированной воды. Плазма-калибратор готова к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Для исследования на агрегометре
Тромбоциты фиксированные. Во флакон с лиофильно высушенными фиксированными человеческими тромбоцитами внести **4 мл** рабочего буферного раствора, перемешать избегая вспенивания. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

Для исследования агглютинационным методом
Виллебранд-реагент (смесь фиксированных тромбоцитов и ристомицина). Во флакон с лиофильно высушенными фиксированными человеческими тромбоцитами внести 1мл раствора ристомицина, перемешать, избегая вспенивания. Затем содержимое флакона перенести во флакон с лиофильно высушенными тромбоцитами, перемешать, избегая вспенивания. Реагент готов к проведению анализа через 20 минут после разведения.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ НА АГРЕГОМЕТРЕ
Построение калибровочного графика
Приготовить серию разведений плазмы-калибратора в следующей последовательности:

Пробирка №	1	2	3
Активность фактора Виллебранда,% *	1А	0,5А	0,25А
Рабочий буферный раствор, мл	0.4	0.3	0.3
Плазма-калибратор, мл	0.2		
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл		0.3	0.3

*А - активность фактора Виллебранда в плазме - калибраторе, указана в паспорте на набор.

Проведение анализа

Исследуемую плазму непосредственно перед анализом развести рабочим буферным раствором в **3** раза.

Подготовить агрегометр к работе согласно инструкции. Кривые агглютинации тромбоцитов записываются без калибровки каналов прибора.

Опустить в кювету магнитную мешалку, затем внести **200** мкл суспензии фиксированных тромбоцитов, инкубировать в термостате агрегометра при 37°С в течение 2 минут. Перенести в измерительную ячейку кювету с прогретой суспензией тромбоцитов и включить перемешивание. При перемешивании внести в кювету с прогретыми тромбоцитами **50** мкл каждого разведения плазмы-калибратора (или исследуемой) плазмы. Через 1 минуту при перемешивании добавить **50** мкл ристомицина.

Регистрация результатов

Регистрация проводится в течение 3-5 минут в зависимости от времени агглютинации тромбоцитов согласно инструкции прилагаемой к анализатору.

- Для агрегометров следует воспользоваться программой определения фактора Виллебранда соответствующего анализатора.
- Следует обратить внимание на рекомендации производителя по разведениям плазмы-калибратора и исследуемых образцов.
- Калибровочный график должен быть построен для каждой серии реагентов.
- При построении калибровочного графика вручную значения активности фактора Виллебранда в разведениях плазмы-калибратора в %, отложить на оси X билогарифмической координатной сетки. На оси Y отложить значения скорости нарастания агрегации каждого разведенного образца плазмы-калибратора. Через полученные точки провести калибровочный график, который должен представлять собой прямую линию в диапазоне активности фактора Виллебранда от 10 до 100%. По калибровочному графику определить активность фактора Виллебранда в %.
- При анализе плазмы пациентов с высокой (более 100%) активностью фактора Виллебранда развести плазму в **6 раз**, а полученное значение умножить на 2.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ АГГЛЮТИНАЦИОННЫМ МЕТОДОМ

1. Проведение количественного анализа

Построение и использование калибровочного графика

Приготовить серию разведений плазмы-калибратора в следующей последовательности:

Пробирка №	1	2	3	5
Активность фактора Виллебранда, %*	1А	0,5А	0,25А	0,125А
Рабочий буферный раствор, мл	0.8	0,5	0.5	0.5
Плазма-калибратор, мл	0.2			
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл		0.5	0,5	0.5

Во всех 4 разведениях провести определение активности фактора Виллебранда по методу, описанному ниже.

Проведение анализа

Исследуемую плазму непосредственно перед анализом развести рабочим буферным раствором в 5 раза.

Анализ проводится на предметном стекле.

Внести на поверхность предметного стекла	Объем
Разведение исследуемой плазмы (плазмы-калибратора, контрольного образца)	50мкл
Виллебранд - реагент	50мкл

Регистрация результатов

В проходящем свете (можно использовать осветитель для микроскопа) на темном фоне при непрерывном покачивании предметного стекла зарегистрировать время от момента добавления Виллебранд - реагента до начала появления агглютинации.

На оси Y по логарифмической шкале отложить время образования агглютинатов в секундах, а на оси X по логарифмической шкале отложить активность vWF в %. Калибровочный график линеен в интервале активности vWF от 10 до 100%.

Используя калибровочный график и значение времени образования агглютинатов в исследуемом образце определить активность фактора Виллебранда в %.

Образцы с высоким уровнем активности фактора Виллебранда могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности фактора Виллебранда для таких образцов могут быть получены при разведении исследуемой плазмы в 10 раз. В этом случае полученный результат следует умножить на 2.

2. Проведение полуколичественного анализа

Приготовление разведений плазмы-калибратора и исследуемого образца.

Развести плазму-калибратор и исследуемую плазму в 5, 10, 20, 40 и 80 раз рабочим буферным раствором;

Проведение анализа

На прозрачную стеклянную поверхность (предметное стекло) вносят по: 50 мкл каждого разведения плазмы-калибратора или исследуемой плазмы и по 50 мкл Виллебранд-реагента.

В течение 1 минуты реакционные смеси непрерывно перемешивают, покачивая стеклянную пластину, и затем оставляют на горизонтальной поверхности без перемешивания на 1 минуту.

Регистрация результатов

В боковом проходящем свете на черном фоне определяют наибольшее разведение плазмы-калибратора и исследуемой плазмы, при котором наблюдается четкая агглютинация тромбоцитов.

Расчеты

Активность фактора Виллебранда в исследуемом плазме рассчитать по формуле:

А=Ак х **Т/Тк,** где

А – активность фактора Виллебранда в исследуемой плазме,

Ак - активность в плазме-калибраторе,

Т – наибольший титр при котором наблюдается агглютинация тромбоцитов в исследуемом плазме,

Тк - наибольший титр при котором наблюдается агглютинация тромбоцитов в плазме-калибраторе.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Срок годности набора – 24 месяца. Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укупоренном виде при температуре 2-8°С.

Транспортирование набора допускается при температуре +18-25ºС в течение 2 недель.

Растворенные компоненты набора можно хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность реагентов

Реагенты	**+2-8^{0}С**	**+18-22^{0}С**	**-18-20^{0}С**
Тромбоциты	8 часов	8 часов	-
Ристомицин	7 дней	1 день	2 мес.
Виллебранд-реагент	8 часов	8 часов	-
Плазма – калибратор	8 часов	2 часа	2 мес.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Нормальные и патологические значения активности фактора Виллебранда следует контролировать с помощью Плазмы контрольной производства НПО РЕНАМ, код КМ-2.

МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СП № 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором реагентов Фибриноген-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.

Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на ¾, 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.

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