

УТВЕРЖДЕНА
приказом Росздравнадзора
от « » 2010 г.
№

«УТВЕРЖДАЮ»
Президент МБООИ «Общество
больных гемофилией»

 2010 г.

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Виллебранд-тест предназначен для определения активности фактора Виллебранда (ф. Виллебранда) в плазме крови человека с целью диагностики дефицита этого фактора, приводящего к развитию геморрагического синдрома.

Один набор предназначен для проведения 20 мануальных определений при расходе по 0,05 мл раствора Виллебранд-реагента на один анализ или для проведения 20 определений на агрегометре при расходе по 0,2 мл суспензии фиксированных тромбоцитов и по 0,05 мл раствора ристомидина на один анализ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод основан на способности ф. Виллебранда вызывать агглютинацию тромбоцитов в присутствии антибиотика ристомидина (ристоцетина), сохраняющуюся у тромбоцитов после фиксации формальдегидом, когда полностью утрачивается реакция на другие индукторы агрегации.

2.2. Состав набора

1. Фиксированные тромбоциты человека, лиофильно высушенные – 1 флакон.
2. Ристомидин, лиофильно высушенный – 1 флакон.
3. Плазма-калибратор, лиофильно высушенная – 1 флакон.
4. Буферный раствор, концентрированный, для определения на агрегометре – 1 флакон (5,0 мл).
5. Виллебранд-реагент, лиофильно высушенная смесь фиксированных тромбоцитов человека и ристомидина для мануального определения – 1 флакон.
6. Буферный раствор, концентрированный, для мануального определения – 1 флакон (5,0 мл).

Визанка

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Ф. Виллебранда циркулирует в плазме крови человека в виде комплекса с VIII фактором свертывания и обеспечивает взаимодействие тромбоцитов с поврежденной поверхностью сосудов. Снижение содержания ф. Виллебранда в плазме крови или отсутствие у него биологической активности является основной причиной возникновения геморрагического синдрома, проявляющегося при болезни Виллебранда, поэтому определение активности ф. Виллебранда является одним из главных диагностических тестов этого приобретенного или наследственного заболевания.

В нормальной плазме здоровых лиц активность ф. Виллебранда составляет 50-150%, при болезни Виллебранда активность этого фактора может быть резко снижена (до 3%).

Активность ф. Виллебранда в плазме-калибраторе - 70-130%. Отклонение активности ф. Виллебранда в плазме-калибраторе от аттестованного значения - не более 15%.

Чувствительность определения - 15%.

Коэффициент вариации результатов определения - не более 15%.

Отклонение от «линейности» не более 15% в диапазоне активностей ф. Виллебранда от 25 до 100% (мануальное определение) и в диапазоне от 13 до 130% (определение на агрегометре).

Допустимый разброс результатов при измерении активности ф. Виллебранда в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии - не более 15%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

4.2. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- Агрегометр с набором кварцевых кювет;
- магнитные мешалки к агрегометру;
- компьютерная программа к агрегометру, переводящая значения показателей прибора в значения активности ф. Виллебранда, %;

- центрифужные пробирки, пластиковые или стеклянные силиконизированные, вместимостью 10 мл;
- предметные стекла;
- секундомер;
- пипетки полуавтоматические, позволяющие отбирать 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 мл;
- бумага масштабнo-координатная билогарифмическая;
- центрифуга лабораторная, развивающая ускорение 1200 g;
- вода дистиллированная;
- мерные колбы вместимостью 50 и 100 мл;
- 0,11 М раствор натрия лимоннокислого;
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Венозную кровь отобрать в силиконизированную стеклянную или пластиковую пробирку с 3,8% (0,11 моль/л) цитратом натрия (9:1). Центрифугировать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 7 мин при 1000 об/мин (240 g), плазму перенести в другую пробирку и повторно центрифугировать при комнатной температуре в течение 15 мин при 3000 об/мин (1200 g).

Центрифугирование следует проводить как можно скорее после взятия крови. Немедленно после повторного центрифугирования перенести плазму в другую пластиковую пробирку.

Время хранения образцов при комнатной температуре – не более 4 ч, при температуре 2-8°C - не более 8 ч.

Допускается однократное замораживание плазмы при температуре минус 20°C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. МАНУАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

7.1.1. Полуколичественный анализ

7.1.1.1. Приготовление реагентов

Рабочий буферный раствор для мануального определения

Содержимое флакона с буферным раствором концентрированным для мануального определения перенести количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести до метки дистиллированной водой (разведение в 20 раз). Рабочий буферный раствор готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

Раствор Виллебранд-реагента

Во флакон с лиофильно высушенным Виллебранд-реагентом внести 1,0 мл дистиллированной воды, перемешать пипетированием, избегая вспенивания. Реагент готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

Раствор плазмы-калибратора

Во флакон с плазмой-калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды. Плазма-калибратор готова к проведению анализа через 20 мин после разведения.

7.1.1.2. Стабильность реагентов

Реагенты	2-8 ⁰ С	18-25 ⁰ С	- 18-20 ⁰ С
Раствор Виллебранд-реагента	5 сут	8 ч	-
Раствор плазмы-калибратора	8 ч	2 ч	2 мес
Рабочий буферный раствор для мануального определения	10 сут	-	-

7.1.1.3. Приготовление разведений плазмы-калибратора и исследуемого образца плазмы крови пациента.

Образец исследуемой плазмы пациента и раствор плазмы-калибратора развести рабочим буферным раствором по следующей схеме:

Пробирка №	1	2	3	4	5
Разведение (в раз)	10	20	40	80	100
Рабочий буферный раствор для мануального определения, мл	0,9	0,5	0,5	0,5	0,9
Раствор плазмы-калибратора, или плазмы крови пациента, мл	0,1	-	-	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	0,5 — 0,1 —	0,5 —	0,5 —	—	-

7.1.1.4. Проведение исследования

На прозрачную стеклянную пластину (предметное стекло) нанести в 1 ряд по 50 мкл каждого разведения плазмы-калибратора и в другой ряд по 50 мкл соответствующего разведения плазмы крови пациента.

Внести в каждую каплю по 50 мкл раствора Виллебранд-реагента.

В течение 1 мин реакционные смеси непрерывно перемешивать, покачивая стеклянную пластину, затем оставить на 1 мин на горизонтальной поверхности без перемешивания.

После этого в боковом проходящем свете на черном фоне определить наибольшее разведение исследуемого образца плазмы крови пациента и плазмы-калибратора, при котором еще наблюдается четкая агглютинация тромбоцитов (значение в крестах ±).

7.1.1.5. Расчеты

Активность ф. Виллебранда (А, %) в исследуемом образце плазмы крови пациента рассчитать по формуле:

$$A = A_K \times T/T_K,$$

где: A_K - активность ф. Виллебранда в максимально разведенном образце плазмы-калибратора с четкой агглютинацией тромбоцитов, %;

T – наибольшее разведение, при котором наблюдается агглютинация тромбоцитов в максимально разведенном образце плазмы крови пациента, значение в крестах $\pm$;

T_K – наибольшее разведение, при котором наблюдается агглютинация тромбоцитов в максимально разведенном образце плазмы-калибратора, значение в крестах $\pm$.

7.1.2. Количественный анализ

7.1.2.1. Построение калибровочного графика

Приготовить серию разведений плазмы-калибратора в следующей последовательности:

Пробирка №	1	2	3
Активность ф. Виллебранда, %	1 А	0,5 А	0,25 А
Рабочий буферный раствор для мануального определения, мл	0,9	0,5	0,5
Раствор плазмы-калибратора, мл	0,1	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	0,5	0,5	0,5

А - активность ф. Виллебранда в плазме-калибраторе, указанная в паспорте на набор.

Во всех разведениях плазмы-калибратора провести определение активности ф. Виллебранда по следующему методу:

Внести на поверхность предметного стекла	Объем
Разведения плазмы-калибратора	50 мкл
Раствор Виллебранд-реагента	50 мкл

В проходящем свете (например, осветитель для микроскопа) на темном фоне при непрерывном покачивании предметного стекла зарегистрировать по секундомеру время, сек, от момента добавления Виллебранд-реагента к разведенному образцу плазмы-калибратора до начала появления агглютинации.

На масштабно-координатной билогарифмической бумаге по вертикальной логарифмической оси ординат (Y) отложить время образования агглютинатов в разведенных образцах плазмы-калибратора, сек, а по логарифмической горизонтальной оси абсцисс (X) отложить соответствующую активность ф. Виллебранда, %.

Калибровочный график линеен в интервале активности ф. Виллебранда от 25 до 100%.

7.1.2.2. Проведение исследований

Плазму крови пациента непосредственно перед анализом развести рабочим буферным раствором в 10 раз (1:9).

На чистую стеклянную поверхность (предметное стекло) нанести 50 мкл разведенной в 10 раз исследуемой плазмы крови пациента и в ту же каплю внести 50 мкл раствора Виллебранд-реагента.

В проходящем свете (например, осветитель для микроскопа) на темном фоне при непрерывном покачивании предметного стекла зарегистрировать по секундомеру время, сек, от момента добавления Виллебранд-реагента к разведенному образцу плазмы крови пациента до начала появления агглютинации.

По времени наступления агглютинации в исследуемом образце плазмы крови пациента определить по калибровочному графику активность ф. Виллебранда, %.

Каждое определение повторить еще 2 раза и рассчитать среднее арифметическое значение.

7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НА АГРЕГОМЕТРЕ

7.2.1. Приготовление реагентов

Рабочая суспензия фиксированных тромбоцитов

Во флакон с лиофильно высушенными фиксированными тромбоцитами человека внести 4,0 мл рабочего буферного раствора для определения на агрегометре, перемешать пипетированием, избегая вспенивания. Реагент готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

Рабочий раствор ристомидина

Во флакон с ристомидином внести 1,0 мл дистиллированной воды, перемешать покачиванием. Реагент готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

Рабочий буферный раствор для определения на агрегометре

Содержимое флакона с буферным раствором концентрированным для определения на агрегометре перенести количественно в мерную колбу вместимостью 50 мл и довести до метки дистиллированной водой (разведение в 10 раз). Рабочий буферный раствор готов к проведению анализа через 20 мин после разведения.

7.2.2. Стабильность реагентов

Реагенты	2-8 ⁰ С	18-25 ⁰ С	-18-20 ⁰ С
Рабочая суспензия фиксированных тромбоцитов	8 ч	8 ч	-
Рабочий раствор ристомидина	7 сут	1 сут	2 мес.
Рабочий буферный раствор для определения на агрегометре	10 сут	-	-

7.2.3. Построение калибровочного графика

7.2.3.1. Разведение плазмы-калибратора

Для приготовления разведений плазмы-калибратора необходимо использовать только пластиковые или стеклянные силиконизированные пробирки.

Приготовить серию разведений плазмы-калибратора в следующей последовательности:

Пробирка №	1	2	3
Активность ф. Виллебранда, %	1 А	0,5 А	0,25 А
Рабочий буферный раствор для определения на агрегометре, мл	0,5	0,5	0,5
Раствор плазмы-калибратора, мл	0,5	-	-
Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл	0,5	0,5	

А - активность ф. Виллебранда в плазме-калибраторе, указанная в паспорте на набор.

7.2.3.2. Проведение анализа

Подготовить агрегометр к работе согласно инструкции к прибору.

Исследуемую плазму крови пациента непосредственно перед анализом развести рабочим буферным раствором в 4 раза.

Кривые агглютинации тромбоцитов записывать без калибровки каналов прибора.

Построение калибровочного графика и последующий анализ плазмы пациента можно провести по компьютерной программе или мануальным методом в следующей последовательности:

1. Опустить в кювету агрегометра магнитную мешалку, затем внести в ту же кювету 0,2 мл рабочей суспензии фиксированных тромбоцитов, инкубировать в термостате агрегометра при температуре 37°C в течение 2 мин.
2. Перенести кювету с прогретой рабочей суспензией тромбоцитов в измерительную ячейку и включить перемешивание.
3. При перемешивании внести в кювету с рабочей прогретой суспензией тромбоцитов 0,05 мл одного из разведений плазмы-калибратора или исследуемой плазмы крови пациента. Через 1 мин при перемешивании добавить 0,05 мл рабочего раствора ристомидина.
4. Регистрацию максимальной агглютинации каждого разведенного образца провести в течение 3 мин согласно инструкции к прибору.
5. Исследование провести со всеми разведениями плазмы-калибратора.
6. На билогарифмической масштабной-координатной бумаге построить калибровочный график зависимости агглютинации, усл. ед. (ось Y) от активности ф. Виллебранда, % (ось X). График должен представлять прямую линию.
7. Калибровочный график использовать только в день проведения анализов.
8. По калибровочному графику определить активность ф. Виллебранда, %, в образце плазмы крови пациента.
9. Полученный по калибровочному графику результат активности ф. Виллебранда в плазме пациента умножить на 2 для получения 1 А активности ф. Виллебранда, %.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении мануального определения регистрация результатов количественного определения активности ф. Виллебранда проводится путем установления наибольшего разведения исследуемой плазмы, при котором еще наблюдается четкая агглютинация тромбоцитов, %, а регистрация результатов количественного анализа проводится по калибровочному графику разведений плазмы-калибратора с известной активностью ф. Виллебранда, %.

При проведении определения на агрегометре регистрацию результатов анализа активности ф. Виллебранда, %, проводят с применением компьютерной программы к агрегометру или мануальным методом, последовательно внося в кювету агрегометра тромбоциты, исследуемую плазму и ристомидин и получая результаты по калибровочному графику разведений плазмы-калибратора.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Образцы с низким уровнем активности ф. Виллебранда могут выйти за пределы линейности, что приводит к искажению результатов. Поэтому точные значения активности ф. Виллебранда для таких образцов при определении на агрегометре могут быть получены при разведении исследуемой плазмы пациентов не в 4, а в 2 раза.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре 2-8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение наборов при температуре до 25°C не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

Рабочую суспензию фиксированных тромбоцитов можно хранить при температуре 2-8°C и при комнатной температуре (18-25°C) не более 8 ч.

Рабочий раствор ристомидина можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 сут, при комнатной температуре не более 1 сут или в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°C не более 2 мес.

Плазму-калибратор можно хранить при температуре 2-8°C не более 8 ч, при комнатной температуре не более 2 ч или в замороженном состоянии при температуре минус 18-20°C не более 2 мес.

Раствор Виллебранд-реагента можно хранить при комнатной температуре не более 8 ч или при температуре 2-8°C не более 5 сут.

Рабочие буферные растворы можно хранить не более 10 сут при температуре 2-8°C.

По вопросам, касающимся качества набора Виллебранд-тест, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу:

125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4, Гематологический научный центр РАМН, тел/факс (495) 614-90-57, e-mail: renam@blood.ru

или в Лабораторный Центр ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздравсоцразвития РФ по адресу:

117241, г. Москва, Научный проезд, д. 14 а, тел.: (499) 120-60-96.

Заведующий отделом производства
МБООИ «Общество больных гемофилией»
кандидат биологических наук

 А.Л. Берковский

Научный руководитель
лаборатории клинической коагулологии
ГУ ГНЦ РАМН профессор

 С.А. Васильев