

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro* Набор реагентов для определения активности фактора Виллебранда в плазме крови (**Виллебранд-тест**) по ТУ 9398-031-05595541-2010

НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначенное применение. Медицинское изделие для диагностики *in vitro* «Набор реагентов для определения активности фактора Виллебранда в плазме крови (Виллебранд-тест) по ТУ 9398-031-05595541-2010» (сокращенное наименование – «Виллебранд-тест») предназначено для количественного определения активности фактора Виллебранда в плазме крови как вручную агглютинационным методом, так и на оптических агрегометрах.

Область применения. Область применения набора – клиническая медицина, клиническая лабораторная диагностика.

Предназначенный пользователь. Определение активности фактора Виллебранда с помощью набора Виллебранд-тест может проводить врач-лаборант или фельдшер-лаборант. Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

Диагностическая роль. 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.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Состав набора

Фиксированные человеческие тромбоциты – 2 флакона;

Ристомицин – 8мг/флакон - 2 флакона;

Плазма-калибратор - 1мл/флакон – 1 флакон;

Буфер концентрированный - 5мл/флакон – 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.

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИСПОСОБЛЕННЫХ КАЛИБРАТОРУ

Активность фактора Виллебранда в плазме-калибраторе устанавливаются при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который в свою очередь был аттестован против 6-го Международного Стандарта активности фактора VIII и фактора Виллебранда в плазме, код 07/316, полученного из National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Значения активности фактора Виллебранда в плазме-калибраторе указано в паспорте медицинского изделия.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность

Следующие вещества не влияют на определение активности фактора Виллебранда набором Виллебранд-тест: 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

Минимальная активность фактора Виллебранда, определяемая набором Виллебранд-тест – не более 10%.

Воспроизводимость

Активность фактора Виллебранда в плазме-калибраторе составляет 80 – 120%. Допустимое отклонение активности фактора Виллебранда в плазме-калибраторе от аттестованного значения не более 10%. 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 25 до 100% активности фактора Виллебранда. Отклонение от линейности в этом диапазоне не более 10%.

Значения активности, соответствующие нормальным

Нормальный диапазон значений активности фактора Виллебранда, полученный при определении набором Виллебранд-тест у не менее 100 здоровых доноров, составляет 70-130%, что соответствует биологическому референтному интервалу [1].

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор реагентов Виллебранд-тест предназначен только для диагностики *in vitro*. Класс потенциального риска применения набора –2а.

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

При работе с набором и образцами крови 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).

При работе следует надевать защитную одежду (халат), а также медицинские диагностические одноразовые перчатки, так как 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.

Плазма-калибратор получена из плазмы крови человека, карантинизированной и проверенной на отсутствие антител к ВИЧ 1, 2, вирусу гепатита С и HBsAg. Тем не менее их следует рассматривать как потенциально вирус-опасные.

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 крови. Образцы плазмы крови для анализа не должны быть гемолизированы, содержать сгустки, примесь эритроцитов.

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).

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°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 белков.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочий буферный раствор. Буфер концентрированный (5 мл) развести дистиллированной водой в 20 раз (содержимое флакона перенести в мерную емкость, довести до 100 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать). pH рабочего буферного раствора должен составлять от 7,35 до 7,45. 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.

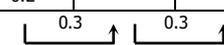
Для исследования агглютинационным методом

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

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ НА АГРЕГОМЕТРЕ

Построение калибровочного графика

Использовать только пластиковые пробирки. Приготовить следующие разведения плазмы-калибратора:

| 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 |  | | |

*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°C** 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 разведению 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 логарифмической 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 25 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 АГГЛУТИНАЦИОННЫМ МЕТОДОМ

1. Проведение количественного анализа

Построение и использование калибровочного графика

Приготовить серию разведений плазмы-калибратора в следующей последовательности:

| Пробирка № | 1 | 2 | 3 |
|------------------------------------|-----|------|-------|
| Активность фактора Виллебранда, %* | 1A | 0,5A | 0,25A |
| Рабочий буферный раствор, мл | 0,8 | 0,5 | 0,5 |
| Плазма-калибратор, мл | 0,2 | | |

Перемешать и перенести в следующую пробирку, мл



Во всех 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 фактора Виллебранда в %. Калибровочный график линеен в интервале активности фактора Виллебранда от 25 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 исследуемой плазме рассчитать по формуле:

$$A = A_k \times T / T_k, \text{ где}$$

A – активность фактора Виллебранда в исследуемой плазме,

A_k – активность в плазме-калибраторе,

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

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

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат меньше чем 40% активности фактора Виллебранда свидетельствует о болезнати Виллебранда. Однако полная диагностика и определение типа этой коагулопатии требует проведения дополнительных исследований.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности реагента при условии хранения в укрупненном виде при температуре 2-8°C. Допускается хранение при температуре до 25°C не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные компоненты набора можно хранить в плотно закупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

| Реагенты | +2-8°C | +18-22°C | -18-20°C |
|---------------------|---------|----------|----------|
| 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. |

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термоиндикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°C не более 10 суток. Замораживание 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 Виллебранд-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 обезвреживания и утилизации.

В соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010 наборы реагентов Виллебранд-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.

СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

| Символ | Наименование символа |
|---|--|
|  | Номер по каталогу |
|  | Медицинское изделие для диагностики in vitro |
|  | Биологический риск |
|  | Температурный диапазон |
|  | Обратитесь к инструкции по применению |
|  | Изготовитель |

Дата утверждения инструкции 20 августа 2010г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алан, Г.Б. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам / Г.Б. Алан. – М.: Лабора, 2013. – 1280 с.

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