

Буфер для відмивання. PBS, що містить 1 г/л полісорбату 20 P.

▼ *Блокувальний* ▲ *реактив.* PBS, що містить 1 г/л полісорбату 20 P та 10 г/л альбуміну бика сироваткового P.

Буфер для розведення. PBS, що містить 1 г/л полісорбату 20 P та 50 г/л альбуміну бика сироваткового P.

Кон'югат. Кон'югат пероксидази хрому з сироваткою крові кроля до фактора фон Віллебранда людини. Використовують відповідно до інструкцій виробника.

Розчин субстрату. Безпосередньо перед застосуванням таблетку о-фенілендіаміну дигідрохлориду та таблетку сечовини пероксиду розчиняють у 20 мл води P або використовують придатний об'єм водню пероксиду. ▼ *Захищати від впливу світла* ▲.

▼ *Мікропланшети* ▲. Полістироловий планшет з плоским дном, поверхня якого оптимізована для проведення імуноферментного аналізу та має високу протеїн-зв'язуючу здатність.

МЕТОД

Випробовувані розчини. Відновлюють випробовуваний препарат, як зазначено на етикетці. Розводять буфером для розведення до отримання розчину з вмістом близько 1 МО фактора фон Віллебранда людини. Готують 2 серії розчинів — не менше 3 розведень у кожній серії, використовуючи буфер для розведення.

Стандартні розчини. Відновлюють стандартний препарат, як зазначено. Розводять буфером для розведення до отримання розчину з вмістом близько 1 МО фактора фон Віллебранда. Готують 2 серії розчинів — не менше 3 розведень в кожній серії, використовуючи буфер для розведення.

Дають розчину колагену нагрітися до кімнатної температури. Доводять розчин колагену розчинником для колагену до отримання розчину, що містить 30–75 мкг/мл колагену, обережно перемішують до отримання однорідної суспензії фібрил колагену. Вносять 100 мкл у кожну лунку планшета для мікротитрування. Накривають планшет поліетиленовою плівкою та інкубують за температури 37 °С протягом ночі. Спорожняють лунки планшета покритого колагеном, перевертаючи планшет, та осушують паперовим рушником. Додають 250 мкл буфера для відмивання. Спорожняють лунки планшета, перевертаючи планшет, та осушують паперовим рушником. Повторюють цю операцію тричі. Додають 250 мкл блокувального реактиву в кожну лунку, накривають планшет поліетиленовою плівкою та інкубують за температури 37 °С протягом 1 год. Спорожняють лунки планшета, перевертаючи планшет, та осушують паперовим рушником. Додають 250 мкл буфера для відмивання. Спорожняють лунки план-

шета, перевертаючи планшет, та осушують паперовим рушником. Повторюють цю операцію тричі.

Додають у лунки по 100 мкл кожного з випробовуваних або стандартних розчинів. Додають 100 мкл буфера для розведення в ряд лунок (негативний контроль). Накривають планшет поліетиленовою плівкою та інкубують за температури 37 °С протягом 2 год. Спорожняють лунки планшета, перевертаючи планшет, та осушують паперовим рушником. Додають 250 мкл буфера для відмивання. Спорожняють лунки планшета, перевертаючи планшет та осушують паперовим рушником. Повторюють цю операцію тричі.

Готують придатне розведення кон'югата (наприклад, з коефіцієнтом розведення 1:4000) з PBS, що містить 5 г/л альбуміну бика сироваткового P, та додають 100 мкл у кожну лунку. Накривають планшет поліетиленовою плівкою та інкубують за температури 37 °С протягом 2 год. Спорожняють лунки планшета, перевертаючи планшет, та осушують паперовим рушником. Додають 250 мкл буфера для відмивання. Спорожняють лунки планшета, перевертаючи планшет, та осушують паперовим рушником. Повторюють цю операцію тричі.

Додають 100 мкл розчину субстрату в кожну лунку та інкубують у темряві за кімнатної температури протягом 20 хв. Додають 100 мкл 1 M розчину хлористоводневої кислоти в кожну лунку.

Вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 492 нм. Використовують величини оптичної густини для обчислення активності випробовуваного препарату; використовують звичайні методи статистичного аналізу (5.3).

Кількісне визначення вважається ▼ *непридатним* ▲, якщо величини оптичної густини, виміряні для негативних контролів, складають більше 0.05.

2.7.22 КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРА ЗГОРТАННЯ КРОВІ ЛЮДИНИ XI

Принцип кількісного визначення полягає у вимірюванні здатності препарату фактора XI скорочувати тривалість часу згортання дефіцитної за фактором XI плазми. Реакцію прискорюють додаванням реактиву, що містить фосфоліпід та контактний активатор, наприклад каолін, діоксид кремнію або елагову кислоту. Активність оцінюють порівнянням кривої залежності «доза-відповідь» випробовуваного препарату зі стандартною плазмою, каліброваною до міжнародного стандарту в плазмі для фактора згортання крові людини XI.

БСП плазми факторів згортання крові V, VIII, XI та XIII придатні для застосування як стандартний препарат.