

ИНСТРУКЦИЯ

по применению реагентов для определения активности нефракционированного гепарина клоттинговым методом

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты предназначены для определения активности нефракционированного гепарина (НФГ) клоттинговым методом в препаратах и субстанциях, а также в процессе их производства в соответствии с требованиями Российской Фармакопеи.

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТОВ

Состав реагентов

АЧТВ-НФГ реагент - лиофильно высушенный реагент на основе кроличьих мозговых фосфолипидов и активатора – каолина, 2 мл/флакон. Код P-37.

PCO-НФГ - лиофильно высушенный свиной мукозный нефракционированный гепарин натрия с буфером и стабилизатором, 1 мл/флакон. Код P-40.

Плазма цитратная человеческая с параметрами гемостаза в пределах нормы, лиофильно высушенная с буфером и стабилизатором, 1 мл/флакон Код P-38 или

Плазма цитратная овечья с параметрами гемостаза в пределах нормы, лиофильно высушенная с буфером и стабилизатором, 1 мл/флакон, Код P-39

Кальций хлористый, 0,025 М раствор, 5 мл/флакон, Код P-9 или

Кальций хлористый, 0,035 М раствор, 5 мл/флакон, Код P-44

Число анализируемых проб биологического материала

Зависит от используемого метода и оборудования.

Принцип метода

К одному из разведений исследуемого образца нефракционированного гепарина (раствора субстанции или препарата) последовательно добавляют цитратную плазму крови и АЧТВ-НФГ реагент, представляющий собой эмульсию кроличьих мозговых фосфолипидов с буфером, стабилизатором и активатором внутреннего пути свертывания каолином. Реакция запускается хлоридом кальция. В процессе измерения АЧТВ регистрируют время от момента добавления ионов кальция до момента образования сгустка, которое сравнивают с временем, полученным при анализе Рабочего Стандартного Образца Нефракционированного Гепарина (PCO-НФГ)

ПРСЛЕЖИВАЕМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ, ПРИПИСАННЫХ PCO-НФГ

Активность гепарина в PCO-НФГ устанавливают при аттестации каждой серии против внутреннего стандарта, который был аттестован против 6-го Международного Стандарта нефракционированного гепарина, код 07/328, полученного из NIBSC. Значения активности гепарина в PCO-НФГ указаны в паспорте.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Воспроизводимость

Коэффициент вариации результатов определения активности НФГ в одном флаконе PCO-НФГ не превышает 5%. Коэффициент вариации результатов определения активности НФГ в разных флаконах PCO-НФГ одной серии не превышает 5%.

Чувствительность

Минимальная активность НФГ, определяемая АЧТВ-НФГ реагентом – не более 0,15 МЕ/мл
 Нормальный диапазон значений АЧТВ, полученный при определении АЧТВ в холостой пробе цитратной человеческой плазмы в отсутствие НФГ составляет в среднем 35 - 45 сек.
 Нормальный диапазон значений АЧТВ, полученный при определении АЧТВ в холостой пробе цитратной овечьей плазмы в отсутствие НФГ составляет в среднем 20 - 30 сек.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Коагулометр любого типа с набором пластиковых кювет;
- весы аналитические;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, вместимостью 50-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки пластиковые вместимостью 10 мл;
- АЧТВ-НФГ реагент; PCO-НФГ, Плазма цитратная, кальций хлорид, 0,025М раствор или 0,035М раствор;
- физиологический раствор, 0,15 М раствор натрия хлорида;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Вид анализируемого биологического материала

Реагенты предназначены для анализа препаратов и субстанций нефракционированного гепарина как конечных, так и в процессе их производства.

Процедура получения биологического материала

Субстанция НФГ

Приготовить раствор субстанции НФГ в физиологическом растворе с концентрацией 1 мг/мл (Раствор 1), взвесив на аналитических весах точно 10мг субстанции и растворив навеску в 10 мл физиологического раствора.

Растворы для анализа приготовить по следующей схеме:

Пробирка №	1	2	3	4
Разведение в раз	10	200	260	338
Раствор 1, мл	0,1	-	-	-
Физиологический раствор, мл	0,9	1,9	0,3	0,3
Перемешать и перенести в пробирку, мл	0,1	1,0	1,0	1,0

Препарат НФГ

Растворы для анализа приготовить по следующей схеме:

Пробирка №	0	1	2	3	4
Разведение в раз		2500	3250	425	5493
Препарат НФГ, мл	0,1	-	-	-	-
Физиологический раствор, мл	9,9	2,4	0,3	0,3	0,3
Перемешать и перенести в пробирку, мл	0,1	1,0	1,0	1,0	1,0

Условия хранения анализируемого материала

Время хранения растворов НФГ для анализа - не более 2 ч при комнатной температуре от плюс 18 до плюс 25°С.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

АЧТВ-НФГ реагент. Внести во флакон с АЧТВ-НФГ реагентом 2 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 30 минут после растворения.

Плазма цитратная. Внести во флакон с плазмой 1 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании. Плазма готова к проведению анализа через 30 минут после растворения.

PCO-НФГ. Внести во флакон с PCO-НФГ 1 мл дистиллированной воды, растворить при покачивании.

Растворы для анализа клоттинговым методом приготовить по следующей схеме:

Пробирка №	1	2	3	4	5
Раствор PCO-НФГ, мл	0,2	-	-	-	-
Физиологический раствор, мл	0,8	0,15	0,15	0,15	0,15
Перемешать и перенести в пробирку, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Кальций хлористый 0,025 М раствор или Кальций хлористый 0,035 М раствор. Является готовым реагентом для проведения анализа. Перед анализом прогреть при 37°С. Повторное прогревание вскрытого флакона не рекомендуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение анализа на автоматическом коагулометре

- Выбрать на коагулометре программу для определения АЧТВ.
- Поместить флаконы с приготовленными реагентами в соответствующие ячейки коагулометра.
- Поместить растворы контрольных и исследуемых образцов НФГ в соответствующие ячейки коагулометра.
- Запустить программу измерения.
- Считать результаты определения АЧТВ.

Проведение анализа на полуавтоматическом коагулометре ручным методом

Внести в кювету анализатора:		Объем
Плазма цитратная, мкл		50
Одно из разведений PCO-НФГ или исследуемого образца, мкл		50
АЧТВ-НФГ реагент, мкл		50
Инкубировать при 37°С точно 3 мин.		
Кальция хлорида 0,025 М раствор, мкл		50

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В процессе измерения АЧТВ зарегистрировать время от момента добавления в кювету коагулометра раствора кальция хлорида до момента образования сгустка.

РАСЧЕТЫ

Построение калибровочного графика.

Определив времена свертывания 5 разведений PCO-НФГ, в программе MS Excel или аналогичной построить график зависимости активности НФГ от времени свертывания.

По калибровочному графику определить активность НФГ в разведениях исследуемых образцов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Реагенты не являются источником опасных излучений и выделений в окружающую среду и не представляют рисков, связанных с возможностью взрыва и возгорания.

При работе с реагентом и образцами крови следует соблюдать правила, описанные в «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» (СанПиН 2.1.3. 2630-10 от 30.09.2010).

Каждая доза крови, использованная для получения пула плазмы, взята только от здоровых доноров или здоровых животных. Для получения пула использована только кровь, не содержащая возбудителей инфекций. Однако, ввиду невозможности доказать их полное отсутствие, плазма должна рассматриваться как потенциально инфицированная, способная сохранять и передавать возбудителей вирусной инфекции. Учитывая это, при работе с плазмой необходимо соблюдать все необходимые меры безопасности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Срок годности: PCO-НФГ, АЧТВ-НФГ реагент, Плазма цитратная – 24 месяца, Срок годности: Кальций хлористый, 0,025 М раствор, Кальций хлористый, 0,035 М раствор – 36 месяцев. Не использовать после истечения срока годности!

Реагенты стабильны в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°С. Допускается хранение при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Растворенные реагенты следует хранить в плотно укупоренном состоянии.

Стабильность приготовленных реагентов

PCO-НФГ, АЧТВ-НФГ, Плазмы цитратной

Реагент	+2-8°С	+18-25°С	-18-20°С
PCO-НФГ реагент	4 часа	2 часа	2 мес.
АЧТВ-НФГ реагент	14 суток	1 сутки	2 мес.
Плазма цитратная	4 часа	2 часа	14 суток

Кальций хлористый, 0,025 М раствор, Кальций хлористый, 0,035 М раствор.

Реагенты стабильны в течение всего срока годности при условии хранения в укупоренном виде при температуре от плюс 2 до плюс 25°С. Вскрытый флакон можно использовать повторно при условии хранения при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в плотно укупоренном виде. Прогреть реагент при 37°С на борту коагулометра можно в течение 8 часов. Повторное прогревание реагента не рекомендуется. Замораживание реагента не допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Транспортирование реагентов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термодатчиков в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование реагентов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание допускается PCO-НФГ, АЧТВ-НФГ, Плазмы цитратной. Замораживание реагента Кальций хлористый, 0,025 М раствор, Кальций хлористый, 0,035 М раствор не допускается.

Транспортирование реагентов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термодатчиков в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование реагентов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание допускается PCO-НФГ, АЧТВ-НФГ, Плазмы цитратной. Замораживание реагента Кальций хлористый, 0,025 М раствор, Кальций хлористый, 0,035 М раствор не допускается.

Транспортирование реагентов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термодатчиков в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование реагентов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание допускается PCO-НФГ, АЧТВ-НФГ, Плазмы цитратной. Замораживание реагента Кальций хлористый, 0,025 М раствор, Кальций хлористый, 0,035 М раствор не допускается.

Транспортирование реагентов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термодатчиков в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование реагентов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание допускается PCO-НФГ, АЧТВ-НФГ, Плазмы цитратной. Замораживание реагента Кальций хлористый, 0,025 М раствор, Кальций хлористый, 0,035 М раствор 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 PCO-НФГ с использованием образцов плазмы крови 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.

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 PCO-НФГ с использованием образцов плазмы крови 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 «ЛЕНАМ» 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@lenam.ru