AccuBET

ТАЛ-реактив для гель-тромб теста

Инструкция

Каталожный номер: HG020500, HG020250, HG020125, HG020060, HG020030

Наименование: ТАЛ-реактив AccuBET 0.2 мл/ампула

Упаковка: 50 ампул в коробке

Назначение:

- Для качественного и количественного определения бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, биологических продуктах, радиофармацевтических препаратах и изделиях медицинского назначения методом гель-тромб.
- Для контроля содержания пирогенных веществ или определения эндотоксинов при внутрипроизводственном контроле.
- В других случаях, когда необходимо определение эндотоксинов методом гель-тромб тест.

Принципы:

Ферментативный каскад сериновых протеаз в ТАЛ-реактиве (лизате амебоцитов мечехвостов) активируется очень малыми дозами эндотоксина. В результате данной биохимической реакции образуется сгусток, или гель. По визуальной оценке результатов реакции можно определить содержание эндотоксинов в образце.

Реактивы, входящие в поставку:

Каталожный номер	Наименование	Описание
HG020500	ТАЛ-реактив AccuBET 0,5 ЕЭ/мл, 0.2 мл/ампула	ТАЛ-реактив для гель-тромб теста в ампулах по 0,2 мл, чувствительность 0,5 ЕЭ/мл, 50 ампул в упаковке
HG020250	ТАЛ-реактив AccuBET 0,25 ЕЭ/мл, 0.2 мл/ампула	ТАЛ-реактив для гель-тромб теста в ампулах по 0,2 мл, чувствительность 0,25 ЕЭ/мл, 50 ампул в упаковке
HG020125	ТАЛ-реактив AccuBET 0,125 ЕЭ/мл, 0.2 мл/ампула	ТАЛ-реактив для гель-тромб теста в ампулах по 0,2 мл, чувствительность 0,125 ЕЭ/мл, 50 ампул в упаковке
HG020060	ТАЛ-реактив AccuBET 0,06 ЕЭ/мл, 0.2 мл/ампула	ТАЛ-реактив для гель-тромб теста в ампулах по 0,2 мл, чувствительность 0,06 ЕЭ/мл, 50 ампул в упаковке
HG020030	ТАЛ-реактив AccuBET 0,03 ЕЭ/мл, 0.2 мл/ампула	ТАЛ-реактив для гель-тромб теста в ампулах по 0,2 мл, чувствительность 0,03 ЕЭ/мл, 50 ампул в упаковке

Реактивы, материалы и оборудование, не входящие в поставку:

Вортекс, термоблок или водяная баня (температура 37±1℃); штативы для пробирок, дозаторы переменного объема, парафильм (лабораторная пленка), стерильные наконечники к дозаторам, апирогенные пробирки, вода для ЛАЛ-теста, 75% этиловый спирт.

Примечание: апирогенные пробирки и стерильные наконечники для дозаторов можно приобрести отдельно.

Условия хранения:

Реактивы хранят при температуре 0-25℃, предпочтительно в прохладных условиях, избегая воздействия прямого солнечного света, при относительной влажности не более 80%. Срок годности реактивов составляет 2 года с даты изготовления. После вскрытия реактивы необходимо сразу использовать.

Процедура анализа:

1. Если необходимо, подтвердите заявленную чувствительность ТАЛ-реактива.

1.1 Прогрейте термоблок или водяную баню до 37±1℃

1.2 Подготовьте разведения контрольного стандарта эндотоксина.

Возьмите ампулу с контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ), обработайте горлышко ампулы 75% этиловым спиртом и откройте ампулу, отломав горлышко. Внесите в ампулу 1 мл воды для ЛАЛ-теста и перемешайте на вортексе в течение 15 минут. Далее в соответствии с чувствительностью ТАЛ-реактива подготовьте ряд разведений исходного раствора КСЭ до концентраций, соответствующих 2 λ, λ, 0,5 λ и 0,25 λ (где λ – значение чувствительности ТАЛ-реактива), перемешивая на вортексе в течение 30 секунд на каждом этапе разведения. Например, при использовании ТАЛ-реактива с чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл следует подготовить концентрации КСЭ 0,25 ЕЭ/мл, 0,125 ЕЭ/мл, 0,0625 ЕЭ/мл и 0,0312 ЕЭ/мл.

* После разведения раствор КСЭ может быть закрыт парафильмом и заморожен при температуре -10С. Замороженный раствор КСЭ может храниться в течение 15 дней. Перед каждым использованием его необходимо разморозить при комнатной температуре и перемешать на вортексе в течение 15 минут.

1.3 Подготовьте раствор ТАЛ-реактива с испытуемыми растворами.

Возьмите 18 ампул с ТАЛ-реактивом, откройте их, подпишите и поместите в штатив. Внесите в ампулы соответствующие растворы, как указано в таблице ниже:

Чувствительность эндотоксина (ЕЭ/мл)	0.25				0.125				0.0625				0.0312				Отрицательный контроль	
ТАЛ-реактив	①	②	③	④	①	②	③	④	①	②	③	④	①	②	③	④	①	②
Вода для ЛАЛ-теста (мл)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	0.2
КСЭ (мл)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—	—

После внесения растворов перемешайте ампулы на вортексе, закройте парафильмом и поместите в инкубатор при температуре 37±1℃ на 60 мин±2 минуты. Затем осторожно достаньте ампулы по одной. Аккуратно переверните каждую ампулу на 180 градусов. Если на дне ампулы образовался гель, который не стекает при переворачивании ампулы, результат оценивается как положительный (+), если геля не образовалось или он не удерживается при переворачивании ампулы, результат оценивается как отрицательный (-). Не встряхивайте ампулы во время считывания результатов.

Результаты теста считаются достоверными, если:

В ампулах с отрицательным контролем гель не образовался (-)

В ампулах 0.25λ гель не образовался (-)

В ампулах 2λ образовался гель (+)

Рассчитайте значение чувствительности ТАЛ-реактива (λ c) по формуле:

λ c= antilog (∑X/4)

X = lg (концентрация эндотоксина в конечной точке реакции (+))

Заявленная чувствительность считается подтвержденной в том случае, если полученное в опыте значение λc составило не менее 0.5λ и не более 2λ. Далее в опытах следует использовать значение чувствительности, указанное производителем. Например, если получены следующие результаты:

	0.25(2λ)	0.125(λ)	0.0625(0.5λ)	0.0312(0.25λ)	Отрицательный контроль	Конечная точка реакции (+)
1	+	+	-	-	-	0.125
2	+	+	-	-	-	0.125
3	+	+	-	-		0.125
4	+	+	-	-		0.125

λc = antilog (∑X/4)

= antilog ((lg0.125+lg0.125+lg0.125+lg125)/4)

=0.125 ЕЭ/мл

2. Рутинные испытания

2.1 Прогрейте термоблок или водяную баню до 37±1℃.

2.2 Подготовьте разведения контрольного стандарта эндотоксина:

Возьмите ампулу с контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ), обработайте горлышко ампулы 75% этиловым спиртом и откройте ампулу, отломав горлышко. Внесите в ампулу 1 мл воды для ЛАЛ-теста и перемешайте на вортексе в течение 15 минут, далее подготовьте ряд разведений в концентрации 2λ и 4λ (где λ – значение чувствительности ТАЛ-реактива).

Например: если чувствительность КСЭ составляет 10 ЕЭ/мл, λ=0.125 ЕЭ/мл, тогда выполните действия, в соответствии со схемой ниже:

$$10EU/ml \xrightarrow[1.8ml]{0.2ml} 1.0EU/ml \xrightarrow[1.0ml]{1.0ml} 0.50EU/ml \xrightarrow[0.5ml]{0.5ml} 0.25EU/ml$$

Где в числителе указан объём испытуемого препарата, а знаменателе - объём воды для ЛАЛ-теста.

2.3. Подготовка испытуемого образца:

Рассчитайте значение Максимально допустимого разведения для препарата (МДР) = *c**L / λ

L: предельное содержание бактериальных эндотоксинов, установленное для препарата;

c: концентрация испытуемого образца. Если значение L установлено в ЕЭ/мл, то *c*=1,0 мл/мл; если значение L установлено в ЕЭ/мг или ЕЭ/МЕ, то *c* должно быть выражено в мг/мл или МЕ/мл;

λ: чувствительность ТАЛ-реактива (ЕЭ/мл)

Например: значение ПСБЭ для раствора глюкозы для инъекций составляет 0.5 ЕЭ/мл, λ=0.125 ЕЭ/мл, значение МДР составит 1*0.5/0.125=4.

Затем возьмите пробирку для разведения с 1,5 мл воды для ЛАЛ-теста и перенесите в нее 0,5 мл испытуемого препарата, затем перемешайте.

Внимание: значение pH реакционной смеси должно быть в диапазоне 6-8. При необходимости используйте буферные растворы. Всегда измеряйте pH раствора, который не пойдет в реакцию, чтобы избежать его контаминации pH-электродом.

2.4. Подготовка положительного контроля:

Смешайте 0,5 мл раствора КСЭ с концентрацией 4λ и 0,5 мл препарата в разведении 2 раза меньше, чем необходимо для анализа (если это раствор глюкозы, то смешайте 0,25 мл исходного раствора глюкозы и 0,25 мл воды для ЛАЛ-теста для получения разведения 1/2). Перемешайте полученный раствор на вортексе.

2.5. Подготовка реакционных смесей:

Достаньте ампулы с реактивом в количестве, необходимом для анализа. Обработайте горлышко ампул 75% этиловым спиртом и откройте ампулы, отломав горлышко. Поместите ампулы в штатив.

2.6. Внесение испытуемых растворов. Внесите в ампулы соответствующие растворы, как указано в таблице ниже:

	П		К-		П+		К+	
	①	②	①	②	①	②	①	②
ТАЛ-реактив	1	1	1	1	1	1	1	1
Вода для ЛАЛ-теста			0.2 мл	0.2 мл				
Препарат	0.2 мл	0.2 мл						
КСЭ (2λ)							0.2 мл	0.2 мл
Положительный контроль препарата (2λ)					0.2 мл	0.2 мл		

2.7. После внесения растворов перемешайте ампулы на вортексе и поместите в инкубатор при температуре 37±1℃ на 60 мин±2 минуты.

2.8. Затем осторожно достаньте ампулы по одной. Аккуратно переверните каждую ампулу на 180 градусов. Если на дне ампулы образовался гель, который не стекает при переворачивании ампулы, результат оценивается как положительный (+), если геля не образовалось или он не удерживается при переворачивании ампулы, результат оценивается как отрицательный (-). Не встряхивайте ампулы во время считывания результатов.

2.9. Результаты теста считаются достоверными, если:

В ампулах с отрицательным контролем К- гель не образовался (-)

В ампулах с положительным контролем К+ образовался гель (+)

В ампулах с положительным контролем препарата П+ образовался гель (+)

В пробирках с испытуемым препаратом П:

Если в ампулах с препаратом получены отрицательные результаты, содержание эндотоксинов составляет менее λ*МДР. Если в ампулах с препаратом получены положительные результаты, содержание эндотоксинов более или равно λ*МДР. В случае, когда в одной ампуле получен отрицательный результат, а в другой положительный результат, повторите анализ в 4 повторностях. Если во всех ампулах с препаратом получены отрицательные результаты, то препарат соответствует требованиям.

Предосторожности:

Рекомендованное значение pH реакционной смеси должно быть в диапазоне 6-8. Если оно не укладывается в данный диапазон, его можно довести буферным раствором. Всегда измеряйте pH раствора, который не пойдет в реакцию, чтобы избежать его контаминации pH-электродом.

1. Буферный раствор можно заказать отдельно.
2. Все используемые в анализе реактивы и материалы должны быть свободны от эндотоксинов.
3. Всегда перемешивайте все растворы на вортексе.
4. Не встряхивайте и не трогайте пробирки во время анализа.
5. Если необходимо провести Анализ мешающие факторы, обратитесь к Национальной Фармакопее.
6. Во время опыта образцы должны быть четко промаркированы.
7. Основной реактив изготовлен из лиофилизированного лизата амебоцитов мечехвостов Tachypleus, и может иногда вызывать у некоторых людей аллергические реакции (чихание и/или слезотечение) после контакта. Если возникают такие симптомы, остановите проведение опыта и выйдете в хорошо проветриваемое помещение или открытое пространство.

Ссылки:

1. Kun Wang, The application value of detect of bacterial endotoxin in patients with infectious disease in ICU ward. China Modern Medicine. 2014, 01(b)-0125-02.

2. Van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, et al. Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients[J]. Lancet, 1988, 1(9596):605-609.

3. Ling Wang, Guiping Wang. Endotoxin detecting method and the application summary[J]. China Pharmacist, 2003, 6(5): 316-317.

4. Annex II E Bacterial Endotoxins Test (Kinetic-Turbidimetric method). 2010

Zhanjiang Bokang Marine Biological co., ltd.

#188, RuiYunNan Rd., MaZhang district, Zhan Jiang, Guang Dong, China

Zipcode：524094

International Sales Company: Accumedi Solutions Co., Ltd.

Website: http://www.accumedi.com