

Инструкция по работе с Контрольным Стандартом Эндотоксина (КСЭ)

ЭНДОТОКСИН (E.coli 0113:H10)

Контрольный Стандарт Эндотоксина (КСЭ) может быть использован в качестве контроля как при проведении ЛАЛ-теста, так для проведения процесса депирогенизации с помощью сухожарового оборудования. В лиофилизированном виде рекомендуется хранить при температуре 2-8 С

Рекомендуемые материалы

- 1) Контрольный Стандарт Эндотоксина (КСЭ), 0.5 мкг/флакон (кат.номер E005).
- 2) Вода для ЛАЛ-теста (ЛАЛ-вода).
- 3) 5 мл стерильная пипетка или одноразовый 5 мл шприц
- 4) пленка Parafilm
- 5) Пробирки для разведений (пробирки из стекла, подвергшиеся сухожаровой депирогенизации или сертифицированного стерильного пластика).

Процедура приготовления раствора КСЭ

- 1) Удалите алюминиевый колпачок с флакона.
- 2) Добавьте ЛАЛ воду во флакон с КСЭ. Рекомендуемый исходный объем 5 мл.

а) при использовании пипетки приподнимите пробку, чтобы погасить вакуум, затем ее удалите и добавьте ЛАЛ-воду. Закройте флакон пленкой Parafilm.

Приготовление рабочих разведений эндотоксина

Рабочие разведения эндотоксина можно приготовить 2 способами

А)

-Флакон со стартовым содержанием эндотоксина 1000 Ед\мл (согласно прилагаемому от поставщика сертификату) устанавливается на вихревой мешалке типа «Вортекс» и интенсивно перемешивается в течение 30 минут.

-По истечении заданного времени готовится «десятикратное» разведение согласно методике разведений стандарта эндотоксина. Приготовленный раствор с содержанием эндотоксина 100 Ед/мл перемешивают на вортексе не менее 3 минут.

-Затем готовится следующее «десятикратное разведение» с содержанием 10 Ед/мл, а затем 1 Ед/мл согласно методике и рекомендациям по времени перемешивания.

-Выйдя на разведение, содержащее 1 Ед/мл, готовят ряд 2-х кратных последовательных разведений для проверки заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. При этом при приготовлении каждого разведения также соблюдают перемешивание в вихревом режиме не менее 3 минут.

Растворы с десятикратными разведения эндотоксина могут быть использованы повторно в течение недели. Перед использованием их необходимо активировать интенсивным встряхиванием на вортексе в течении 5 минут

Б)

-Перемешивают на вихревой мешалке «вортекс» в интенсивном режиме не менее

1 мин, с последующим повторением перемешивания через интервалы в 5-10 минут и так далее в течении 30 минут.

-Раствор контрольного стандарта можно хранить при температуре 2-8 С в течении 4 недель. Растворы стандарта не замораживают.

-При приготовлении разведений контрольного стандарта, исходный раствор интенсивно перемешивают на мешалке не менее 30 сек и затем готовят ряд заданных разведений для достижения заданной концентрации. Перед каждым последующим разведением, необходимо перемешивание предыдущего на мешалке не менее 30 сек.

***** соблюдение временных параметров при перемешивании необходимо с целью предотвращения сорбции эндотоксина на стенках пробирок. На первичном освоении методике предпочтительнее работать по схеме А.*

Инструкция по применению КСЕ в валидации процесса депирогенизации

Для контроля процесса депирогенизации рекомендуется использовать Контрольный Стандарт, кат.номер E005 и E0125.

Метод А

- 1) Удалите алюминиевый колпачок с флакона и пробку с каждого флакона и запечатайте флакон двойным слоем алюминиевой фольги.
- 2) Оставьте 2 флакона в качестве позитивного контроля
- 3) Разместите флаконы в сухожаровой печи используемой для валидации
- 4) По окончании депирогенизации соберите флаконы для анализа
- 5) Растворите флаконы с позитивным контролем и контрольным стандартом, подвергшимся обработке, согласно рекомендациям приведенным выше.
- 6) Проведите анализ согласно инструкции проведения ЛАЛ теста
- 7) Рассчитайте снижение концентрации эндотоксина между позитивным контролем и эндотоксином, подвергшимся обработке (расчет проводится путем деления значения концентрации в контроле на значение концентрации в опытном образце. Если данное значение составляет 1000 или выше, то сухожаровое оборудование позволяет достичь более чем 3х.....

Метод В

- 1) Растворите флаконы с КСЭ согласно рекомендациям приведенным выше
- 2) Нанесите небольшие аликвоты КСЭ или его разведений на материал, который должен быть подвергнут депирогенизации.
- 3) Подвергните исследуемый материал процессу депирогенизации
- 4) Извлеките КСЭ из материала путем смыва в минимальном количестве ЛАЛ воды
- 5) Проанализируйте согласно методике проведения ЛАЛ-теста
- 6) Рассчитайте снижение концентрации эндотоксина аналогично методу А.