



ЛАЛ-реактив Rapid для проверки воды для гемодиализа

Проверка воды для гемодиализа на содержание бактериальных эндотоксинов проводится в соответствии с ГОСТ Р 52556- 2006 «Вода для гемодиализа. Технические условия». Проверка должна проводиться ЛАЛ-тестом согласно ОФС «Бактериальные эндотоксины». Норма содержания эндотоксинов в воде для гемодиализа – менее 0,25 ЕЭ/мл. Периодичность такой проверки установлена равной одному месяцу.

НАБОР РЕАКТИВОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ВОДЕ ДЛЯ ГЕМОДИАЛИЗА.

Принимая во внимание сложности, связанные с исполнением фармакопейных требований, а также то обстоятельство, что вода для гемодиализа не относится к лекарственным средствам, и следовательно ее проверка может быть проведена гораздо проще, чем проверка готовых лекарственных средств, производители ЛАЛ-реактива подготовили специальные наборы реактивов, предназначенные именно для проверки воды для гемодиализа по самой простой схеме. Специальные наборы реактивов для проверки воды для гемодиализа:

ЛАЛ-реактив Rapid пробирки на одно определение (50 пробирок)

Положительный контроль для ЛАЛ-реактива Rapid пробирки на одно определение (50 пробирок).



ЛАЛ-реактив Rapid (пробирки с зелеными колпачками). Предназначен для проверки воды для гемодиализа на соответствие требованиям нормативной документации. Чувствительность реактива указана на пробирке с реактивом и зависит от времени инкубирования. ЛАЛ-реактив Rapid может быть использован для проверки на соответствие указанной в ГОСТе нормы – 0,25 ЕЭ/мл. Этот же реактив при более длительном инкубировании имеет большую чувствительность и способен регистрировать концентрацию эндотоксина равную 0,06 ЕЭ/мл.

Положительный контроль для ЛАЛ-реактива Rapid (пробирки с красными колпачками). Предназначен для проверки работоспособности тест-системы и правильности проведения инкубирования реакционной смеси, а также для проверки ингибирования реакции со стороны испытуемого препарата. В этих пробирках ЛАЛ-реактив лиофилизирован с известным количеством эндотоксина, которое гарантирует получение положительных результатов.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ВОДЫ ДЛЯ ГЕМОДИАЛИЗА

Проверка начинается со сбора образцов, который осуществляют в соответствии с утверждённым планом проведения проверки воды для гемодиализа. В плане должно быть указано количество и место точек забора образцов из системы распределения воды, и способы забора проб, исключающие перекрёстную контаминацию эндотоксинами.

Образцы воды следует собирать в стерильные, апиrogenные контейнеры. Это могут быть простые стеклянные пробирки, предварительно депирогенизированы в сухожаровом шкафу. Проще использовать готовые разовые контейнеры из стекла или пластика, которые имеют квалификацию «стерильно» и «не содержат эндотоксинов». Хорошие результаты показали центрифужные полипропиленовые пробирки на 50 мл производства «Sarstedt», каталожный № 62.559.001. Эти пробирки из прочного полипропилена с герметично закрывающейся крышкой. В них можно хранить воду некоторое время или пересылать для проведения анализа в специализированную лабораторию. Хотя считается, что отобранные образцы лучше исследовать сразу, не откладывая их на хранение. Объем воды, отбираемый для анализа, может быть от 2 мл до 30-40 мл. Собственно, на один анализ достаточно 1 мл образца.



ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ВОДЫ ДЛЯ ГЕМОДИАЛИЗА НА СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ.

Проверка на содержание эндотоксинов менее 0,25 ЕЭ/мл.

Для проверки одного образца понадобится:

- Испытуемый образец воды для гемодиализа не менее 1,0 мл, отобранный в апиrogenный контейнер
- ЛАЛ-реактив Rapid (зеленые колпачки) – 2 пробирки
- Положительный контроль для ЛАЛ-реактива Rapid (красные колпачки) – 2 пробирки.

С пробирок снимают алюминиевые колпачки и резиновые пробки. Пробки отбрасывают, на время инкубирования пробирки не закрывают.

В каждую пробирку с ЛАЛ-реактивом и с Положительным контролем добавляют по 0,2 мл (200 мкл) испытуемого образца воды для гемодиализа. Перемешивают реакцию смесь (покачивая пробирки) и немедленно переносят все пробирки в термоста твердотельный (термоблок), разогретый до 37°C. Отмечают время начала инкубирования.

Инкубируют в течение **25 минут** (время для чувствительности 0,25 ЕЭ/мл указано на этикетке пробирки). Точное выдерживание времени инкубирования исключительно важно.





Реакция гелеобразования очень чувствительна к колебаниям и толчкам и может быть необратимо нарушена в случае неаккуратного обращения с пробирками в течение времени инкубирования.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА. В гель-тромб тесте результат, полученный для каждой пробирки, может быть либо отрицательным, либо положительным. Положительным результатом считается образование плотного геля, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180°. Отрицательный результат характеризуется отсутствием геля или формированием вязких гелевых масс, которые не сохраняют своей целостности при переворачивании пробирки.

Отрицательный результат



Положительный результат



В пробирках с ЛАЛ-реактивом **Rapid** результаты должны быть отрицательные.

В пробирках с положительным контролем для ЛАЛ-реактива **Rapid** результаты должны быть положительными.

Испытуемый образец		Положительный контроль	
-	-	+	+

Эти результаты означают, что содержание эндотоксина в проверенном образце воды для гемодиализа меньше 0,25 ЕЭ/мл, и вода соответствует требованиям нормативной документации.

Такой вариант проверки самый простой и не требует ни специальной подготовки аналитика, ни специального оборудования и дополнительных реактивов. Если проверяется одновременно несколько образцов, например, пробы, взятые из разных точек забора воды, то никаких изменений в схему опыта вносить не нужно. Для каждого дополнительно взятого образца берутся две пробирки с зелеными крышками и две пробирки с красными крышками. Если проверяют несколько образцов одновременно, то следует подписывать пробирки во избежание путаницы. Одновременно можно проверить столько образцов, сколько групп из 4х пробирок может поместиться в устройстве для инкубирования (термоблоке).

Проверка на содержание эндотоксинов менее 0,06 ЕЭ/мл.

ЛАЛ-реактив **Rapid** позволяет проверить воду на содержание эндотоксинов менее 0,06 ЕЭ/мл. Зачем это нужно? По правилам GMP для производства лекарственных средств считается, что внутрипроизводственная проверка должна гарантировать содержание эндотоксинов в проверяемом образце в 2-4 раза ниже установленного уровня. В случае воды для гемодиализа это 0,06 ЕЭ/мл. Для того, чтобы проверить воду на это значение, время инкубирования пробирок в термоблоке увеличивают до **35 минут**. Если в пробирках с зелеными колпачками результат отрицательный, значит содержание эндотоксинов ниже 0,06 ЕЭ/мл. Вода очень хорошая.

Схема постановки опыта остается такой же, как и описанная выше, увеличивается только время инкубирования. Надо понимать, что такой опыт целесообразно проводить только в ситуации, когда известно, что качество воды постоянно высокое, и необходимо подчеркнуть это обстоятельство. Если же в таком опыте будут получены положительные результаты для пробирок с зелеными колпачками, это будет означать, что содержание эндотоксинов равно или больше 0,06 ЕЭ/мл. Опыт придется переставить для того, чтобы убедиться в том, что концентрация ниже 0,25 ЕЭ/мл (полное повторение схемы опыта, только инкубирование всего 25 минут).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проверку качества воды для гемодиализа по показателю бактериальные эндотоксины в условиях отделений для гемодиализа лучше всего проводить с помощью специально для этого предназначенных наборов ЛАЛ-реактива **Rapid** в пробирках на одно определение.

2. Схема анализа с таким реактивом предельно оптимизирована и упрощена, а также не требует специальной подготовки образцов или специального оборудования. Все необходимые реактивы и контроли уже внесены в пробирки.

3. В стандартном исполнении опыт позволяет выявить соответствие/несоответствие проверяемого образца требованиям нормативной документации. По желанию

экспериментатора чувствительность метода может быть увеличена в четыре раза путем увеличения времени инкубирования.

Важно! Точное выдерживание времени инкубирования реакционной смеси критически важно. Инкубирование в течение 25 минут показывает соответствие/не соответствие нормы. Время инкубирования, равное 35 минутам, может показать, что содержание эндотоксинов меньше нормы в четыре раза (менее 0,06 ЕЭ/мл). Но если в результате окажется, что концентрация больше 0,06 ЕЭ/мл, то это не будет означать брак. Есть шанс, что содержание все же менее 0,25 ЕЭ/мл. Нужно будет переставить опыт.

Чем больше время инкубирования, тем выше чувствительность определения. Если нет необходимости показать очень низкую концентрацию эндотоксинов, не следует инкубировать реакционные смеси более 25 минут.

4. Описанные выше реактивы и схема постановки опыта лучше всего подходит для проверки воды в условиях отделения гемодиализа. Если проверка проводится в стационарной лаборатории анализ следует проводить либо классическим методом А, либо, что лучше с помощью инструментальных фотометрических методов, позволяющих определить концентрацию эндотоксинов в проверяемой воде.

Подробности:

ООО «НПО «ЛАЛ-Центр», Москва, Нагатинская ул. Д. 3А., строение 5

analiz@limulustest.ru

Разные варианты результатов анализа, причины и следствия.

Испытуемый образец		Положительный контроль	
+	+	+	+

Положительные результаты в пробирках с ЛАЛ-реактивом **Rapid** означают, что вода не соответствует требованиям нормативной документации.

Испытуемый образец		Положительный контроль	
-	-	-	-

Отрицательные результаты в пробирках с положительным контролем для ЛАЛ-реактива **Rapid** означают, что были нарушены условия инкубирования или реактивы испорчены – результат анализа неизвестен. Нужно понять причину отрицательных результатов в положительном контроле и переставить опыт.

Испытуемый образец		Положительный контроль	
-	+	+	+

Разные результаты в пробирках с ЛАЛ-реактивом **Rapid** могут означать техническую ошибку или то, что содержание эндотоксина близко к предельному. Нужно переставить опыт и убедиться, что содержание эндотоксинов ниже нормы.

Испытуемый образец		Положительный контроль	
-	-	-	+

Разные результаты в пробирках с положительным контролем для ЛАЛ-реактива **Rapid** скорее всего означают техническую ошибку – неточное дозирование. Опыт надо переставить.

Испытуемый образец		Положительный контроль	
-	+	-	+

Такие мозаичные результаты скорее всего говорят о технической ошибке при подготовке и постановке опыта. Нужно понять причину ошибки и переставить опыт.

Минимальные требования по оборудованию и материалам, необходимым для проведения анализа.

1. Дозатор для добавления образца воды для гемодиализа в пробирки с ЛАЛ-реактивом и положительным контролем. Одноканальный дозатор фиксированного объема на 200 мкл. Можно использовать дозатор переменного объема на 100-1000 мкл.



2. Наконечники на 200 мкл стерильные, не содержащие эндотоксинов, в штативе.



3. Термостат твердотельный (термоблок) с вставкой для пробирок диаметром 13 мм.



4. Штатив для пробирок диаметром 13 мм.

