
Associates of Cape Cod, Inc.
Gel-Clot Training

ЦЕЛЬ

- Тестирование неизвестного образца

ОБОРУДОВАНИЕ

- Водяная баня или сухой твердотельный термоблок

РЕАКТИВЫ

- **LAL** PYROTELL
- **CSE** Control Standard Endotoxin КСЭ
- **LRW** LAL Reagent Water ЛАЛ ВОДА

(Каждый лот Пиротел и КСЭ идут в паре)

I. Подтверждение заявленной чувствительности

a) Разведите КСЭ, флакон которого содержит 0.5 мкг /флакон (catalog No. E0005), в соответствии с сертификатом анализа, необходимым количеством лал воды, так чтобы концентрация во флаконе достигла **1000 EU/mL**

b) Выполнение разведений для стандартной кривой

Начальная концентрация : **1000 EU/mL**

↓ 1:50 (60 µL [1000 EU/mL] + 2.94 mL LRW)

Указания по разведению:

- 1** – Добавьте ЛАЛ воды во все пробирки
- 2** –Перемешайте изначально разведенный КСЭ
- 3** – Добавьте КСЭ к [20 EU/mL]
- 4** – Перетряхните пробирку
- 5** – Перенесите в следующую пробирку
- Повторите **4/5** -

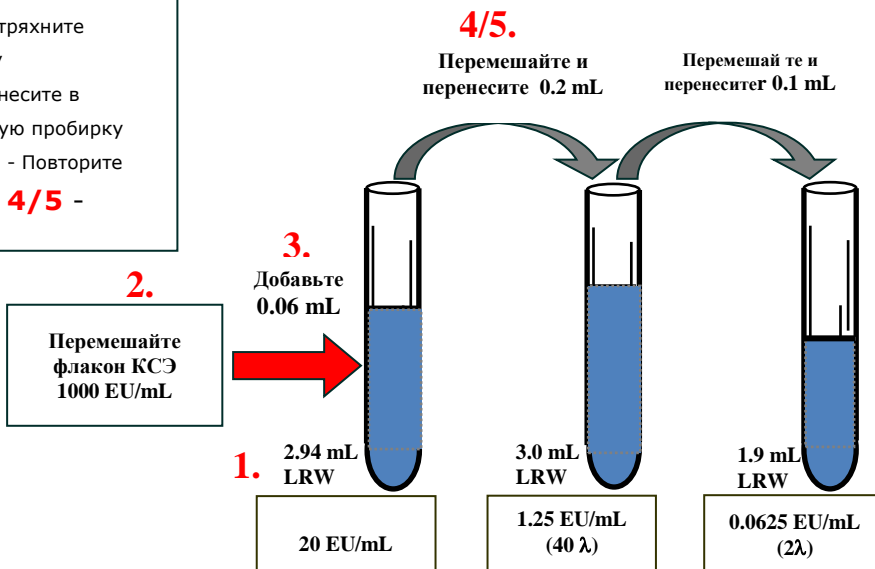
20 EU/mL

↓ 1:16 (0.2 mL [20 EU/mL] + 3.0 mL LRW)

(40λ) 1.25 EU/mL

↓ 1:20 (0.1 mL [1.25 EU/mL] + 1.9 mL LRW)

(2λ) 0.0625 EU/mL



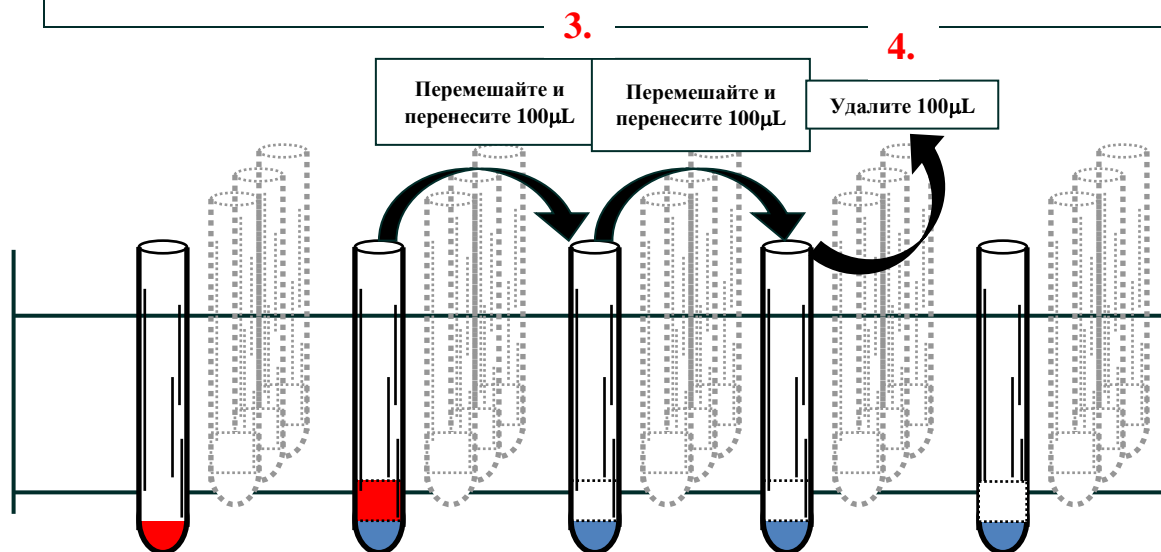
c) Разведите Pyrotell® реактив Pyrosol® (или Glucashield®) буфером или 5 мл лал воды, закройте пленкой Parafilm, аккуратно покрутите и подождите пока реактив полностью не растворится.

Associates of Cape Cod, Inc. Gel-Clot Training

d) Поставьте натрия силикатные пробирки в штатив и выполните разведения:

Указания по разведению:

- 1** – Добавьте лал воду во все пробирки (кроме первой концентрации, 2λ)
- 2** – Добавьте 2λ раствор к первым 2-ум концентрациям (2λ и λ)
- 3** – Перетряхните каждую пробирку коротко и перенесите 100μL в пробирку со следующей концентрацией
- Повторите **3** –
- 4** – Удалите 100μL из пробирки с концентрацией 1/4λ



КСЭ	2λ	λ	1/2λ	1/4λ	Neg. Control
ЛАЛ вода (μL)	-	100	100	100	100
2λ (μL)	100	100	-	-	-

- e) Быстро добавьте 100μL разведенного Pyrotell к каждой реакционной пробирке , энергично встряхните штатив с пробирками в течение 30 секунд
- f) Инкубируйте весь штатив в водяной бане в течение 60 минут
- g) Учет результатов

II. Предварительный/Проверочный тест

Associates of Cape Cod, Inc.

Gel-Clot Training

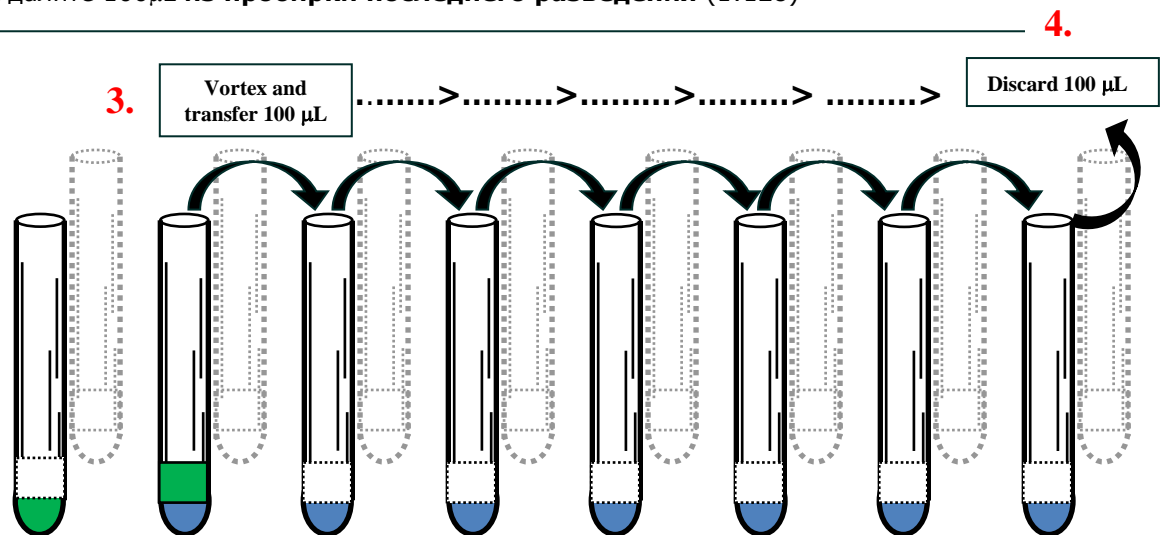
- a) Включает Стандартную кривую (тест на заявленную чувствительность), как показано выше (I.) в 2-ух повторностях

Разведение образца ЛАЛ Водой (в 2-ух повторностях)

- b) Поставьте натрия силикатные реакционные пробирки в штатив и выполните разведения образца:

Указания по разведению:

- 1** – Добавьте лал воду во все пробирки (кроме первого разведения , 1:1)
- 2** – Добавьте исходный образец к первым 2-м разведениям (1:1 и 1:2)
- 3** – Перемешайте коротко каждую реакционную и перенесите 100μL в пробирку со следующим разведением
- Повторите **3** –
- 4** – Удалите 100μL **из пробирки последнего разведения** (1:128)



- 1.**
- 2.**

Dilution	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
LRW (μL)	-	100	100	100	100	100	100	100
Sample (μL)	100	100	-	-	-	-	-	-

- c) Быстро добавьте 100μL разведенного Pyrotell к каждой реакционной пробирке , энергично встряхните штатив с пробирками в течение 30 секунд

- d) Инкубируйте весь штатив в водяной бане в течение 60 минут

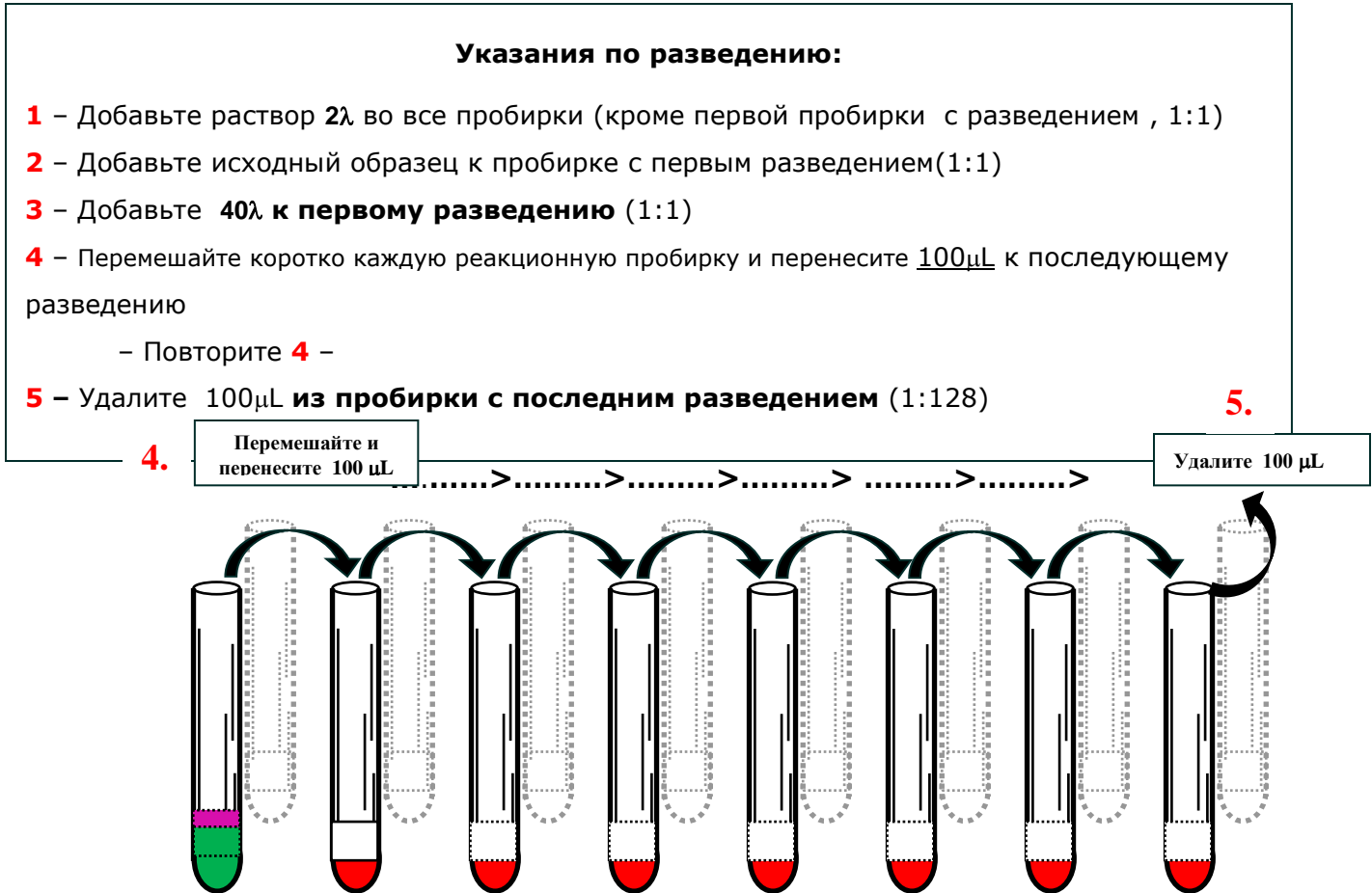
Associates of Cape Cod, Inc.

Gel-Clot Training

е) Учет результатов

Разведение образца на эндотоксине (в 2-ух повторностях)

а) Поставьте натрия силикатные реакционные пробирки в штатив и выполните разведения образца в эндотоксине:



1.
2.
3.

Разведение	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
2л (μL)	-	100	100	100	100	100	100	100
Образец (μL)	200	-	-	-	-	-	-	-
40л (μL)	10	-	-	-	-	-	-	-

б) Быстро добавьте 100μL разведенного Pyrotell к каждой реакционной пробирке , энергично встряхните штатив с пробирками в течение 30 секунд

с) Инкубируйте весь штатив в водяной бане в течение 60 минут

d) Учет результатов

III. Тест на мешающие факторы /Ингибирование & Усиление

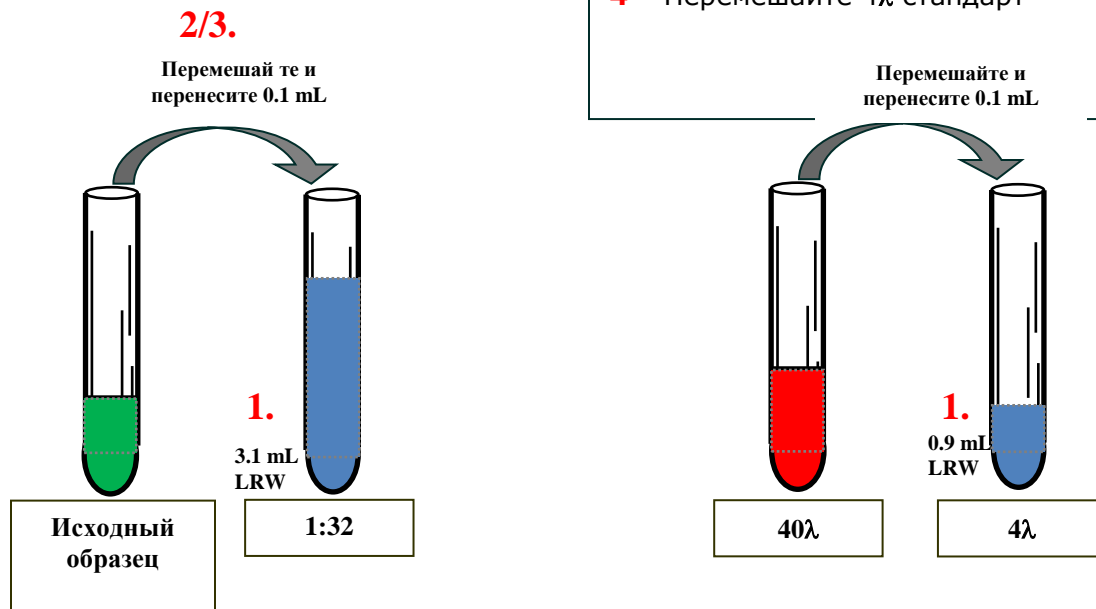
- a) Включает построение стандартной кривой (тест на заявленную чувствительность) как показано выше (**I.**) в 2-ух повторностях
- b) Приготовьте раствор образца в 1/2 концентрации от желаемой для тестирования концентрации образца
(например: приготовьте 1:32 для тестирования в концентрации 1:64)
- c) Приготовьте 4λ из 40λ концентрации стандарта

В. Указания по разведению:

- 1** – Добавьте лал воду в пробирку с разведением (1:32)
- 2** – Перемешайте исходный образец
- 3** – Перенесите 100 μL в следующую пробирку (1:32)

С. Указания по разведению:

- 1** – Добавьте лал воду в пробирку с разведением (4λ)
- 2** – Перемешайте пробирку с 40λ стандартная концентрация
- 3** – Перенести 100 μL в пробирку 4λ
- 4** – Перемешайте 4λ стандарт



- d) Разведите Pyrotell® реактив 5 mL Pyrosol® (or Glucashield®) буфером, закройте пленкой Parafilm, аккуратно прокрутите и подождите пока реактив полностью не растворится.

Associates of Cape Cod, Inc.

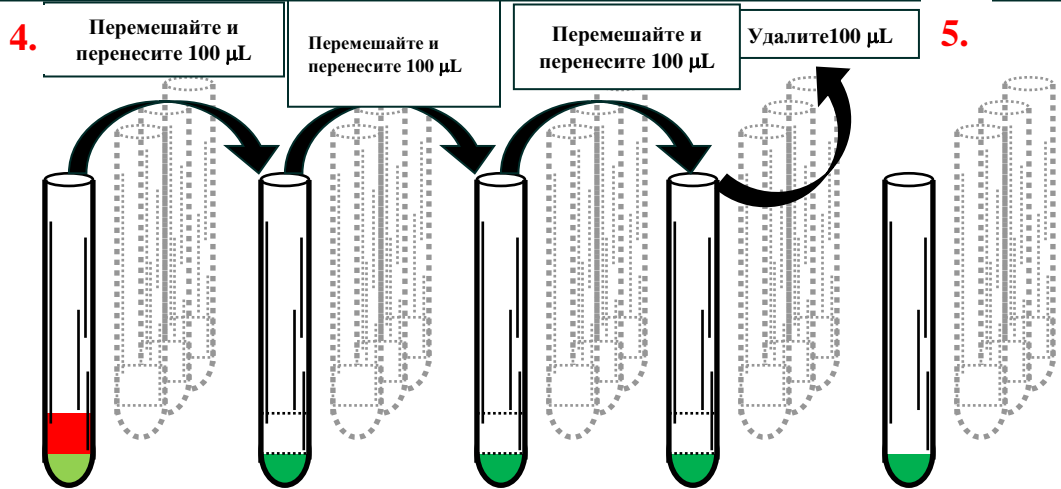
Gel-Clot Training

Стандарт разводится в образце Standards diluted in Sample (в четырех повторностях)

а) Поставьте натрия силикатные реакционные пробирки в штатив и выполните разведения образца в эндотоксине:

Указания по разведению:

- 1** - Добавьте **1:32** к "2λ" пробиркам
- 2** - Добавьте **1:64** к оставшимся пробиркам включая отрицательный контроль to the rest of the tubes including neg. controls
- 3** - Добавьте **4λ** к "2λ" пробиркам
- 4** - Перемешайте каждую реакционную пробирку коротко и перенесите 100μL к следующему разведению
-Повторите **4** -
- 5** - Удалите 100μL из ¼ λ



CSE	2λ	λ	½ λ	¼ λ	Neg. Control
Sample 1:32 (μL)	100	-	-	-	-
Sample 1:64 (μL)	-	100	100	100	100
4λ (μL)	100	-	-	-	-

б) Быстро добавьте 100μL разведенного Pyrotell к каждой реакционной пробирке , энергично встряхните штатив с пробирками в течение 30 секунд

с) Инкубируйте весь штатив в водяной бане в течение 60 минут

d) Учет результатов

IV.Рутинное тестирование (в 2-повторностях)

a) Включает отрицательный и положительный контроли

b) Включает контроль образца (в завалидированном разведении и положительный контроль продукта)

A. Указания:

1 – Добавьте 100 μ L воды к пробирке отрицательному контролю

2 – Добавьте 100 μ L 2 λ к пробирке **положительный контроль**

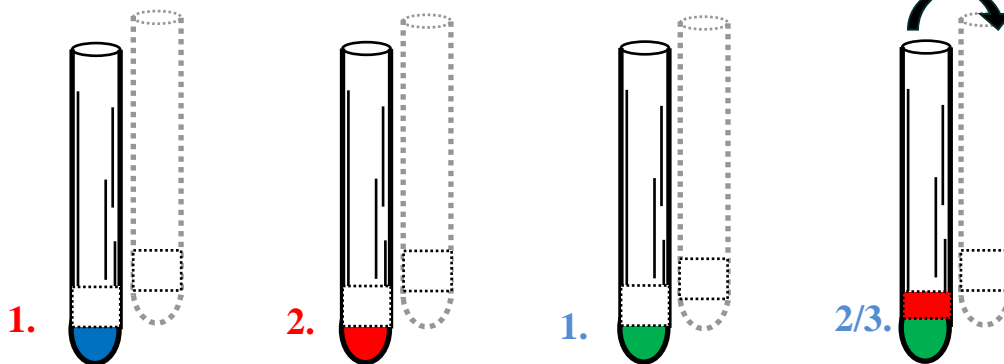
B. Указания:

1 –Добавьте 100 μ L 1:64 к пробирке Образец

2 – Добавьте 200 μ L 1:64 к пробирке положительной контроль продукта PPC

3 – Добавьте 10 μ L 40 λ к пробирке положительный контроль продукта PPC

4 – Перемешайте и перенесите 100 μ L во вторую пробирку PPC



c) Быстро добавьте 100 μ L разведенного Pyrotell к каждой реакционной пробирке , энергично встряхните штатив с пробирками в течение 30 секунд

d) Инкубируйте весь штатив в водяной бане в течение 60 минут

e) Учет результатов

Анализ данных Data Analysis

Associates of Cape Cod, Inc.

Gel-Clot Training

- После завершения анализа , переверните,каждую пробирку (по одной за раз) плавным движением на 180°

Достоверность стандартной кривой

Возможные корректные результаты

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control
+	-	-	-	-
+	-	-	-	-
+	-	-	-	-
+	-	-	-	-

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-
+	-	-	-	-
+	-	-	-	-

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-

Возможные некорректные результаты

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control	2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control
-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
+	-	-	-	-	+	+	+	+	-

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control
+	+	-	-	+
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

Associates of Cape Cod, Inc.
Gel-Clot Training

+	+	-	-	-
---	---	---	---	---

Корректность результата по образцу Validity of sample result
(Предварительный/Проверочный тест) Preliminary/Characterization Test)

Возможные результаты

(Образец на воде) Sample in LRW)

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
+	+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-

(Образец с 2λ)

-Нет ингибирования -

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+

-Ингибирование(преодолевается при 1:4)-

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
-	-	+	+	+	+	+	+
-	-	+	+	+	+	+	+

Достоверность результата тестирования образца

Associates of Cape Cod, Inc.
Gel-Clot Training

(Мешающие факторы /Тест Ингибирование/Усиление)

(Разведения стнадарта в образце в выбранной концентрации)

Пример : 1:64

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control (Sample)
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

-Нет усиления -
Корректно

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control (Sample)
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

-Некоторое усиление -
Корректно

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control (Sample)
+	+	+	+	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-
+	+	+	-	-

-Усиление -
Некорректно

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control (Sample)
+	-	-	-	-
+	-	-	-	-
+	+	-	-	-
+	+	-	-	-

-Некоторое ингибирование-
Корректно

Associates of Cape Cod, Inc.
Gel-Clot Training

2 λ 0.06	λ 0.03	½ λ 0.015	¼ λ 0.008	Negative Control (Sample)
+	-	-	-	-
+	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

-Ингибирование-
Некорректно

**Достоверность результата тестирования образца
(Рутинный тест)**

Neg. Control	2 λ	Sample 1:64	PPC Sample In 2 λ
-	+	-	+
-	+	-	+

Корректно

Neg. Control	2 λ	Sample 1:64	PPC Sample In 2 λ
+	+	-	+
-	+	-	+
Neg. Control	2 λ	Sample 1:64	PPC Sample In 2 λ
-	-	-	+
-	+	-	+
Neg. Control	2 λ	Sample 1:64	PPC Sample In 2 λ
-	+	+	+
-	+	-	+
Neg. Control	2 λ	Sample 1:64	PPC Sample In 2 λ
-	+	-	-
-	+	-	+

Некорректно