

Набор для проведения МАТ

Руководство по проведению теста
на активацию моноцитов
(Методы **A**, **B** и **C**)

Краткое описание теста

Этап 1: Приготовление растворов и инкубирование

1. Приготовьте растворы стандартов эндотоксина и неэндотоксиновые контроли.
2. Приготовьте растворы испытуемых образцов.
3. Приготовьте культуральную среду.
4. Приготовьте моноциты.
5. Внесите стандарты, испытуемые образцы, контроли и моноциты в стерильный 96-ти луночный культуральный планшет для теста на активацию моноцитов.
6. Инкубируйте планшет в течение 20 ± 2 часов.

Этап 2: Определение пирогенных веществ методом ИФА на интерлейкин-6

1. Подготовьте планшет для ИФА с иммобилизованными антителами к интерлейкину-6.
2. Перенесите супернатант из планшета с моноцитами в планшет для ИФА на интерлейкин-6.
3. Инкубируйте планшет в течение 2-х часов при комнатной температуре на шейкере для микропланшетов.
4. Удалите растворы и промойте планшет 4 раза.
5. Добавьте в каждую лунку раствор антител к интерлейкину-6.
6. Инкубируйте планшет в течение 1-го часа при комнатной температуре на шейкере для микропланшетов.
7. Удалите растворы и промойте планшет 4 раза.
8. Добавьте в каждую лунку раствор конъюгата.

9. Инкубируйте планшет в течение 1-го часа при комнатной температуре на шейкере для микропланшетов.
10. Удалите растворы и промойте планшет 4 раза.
11. Добавьте ТМБ-субстрат в каждую лунку.
12. Инкубируйте планшет в течение 15-ти минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
13. Добавьте стоп-реагент в каждую лунку.
14. Проведите измерение оптической плотности растворов в лунках с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм.

Этап 3: Интерпретация данных с помощью соответствующего программного обеспечения

1. Вычитите среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок с культуральной средой (Blank) из значений ОП для всех остальных лунок.
2. Постройте график зависимости ОП от концентрации стандартов эндотоксина
3. Выполните линейную регрессию с использованием теста на линейность
 - a. P-значение регрессии < 0.01 = СООТВЕТСТВУЕТ
 - b. Тест на линейность > 0.05 = СООТВЕТСТВУЕТ
4. С помощью графика определите содержание эндотоксинов в исследуемых образцах.

Содержание

1 Состав набора и условия хранения

- 1.1. Моноциты
- 1.2. Набор MAT Research
- 1.3. Референсный стандарт эндотоксина и неэндотоксиновые пирогеновые контроли

2 Введение

- 2.1. Общие сведения
- 2.2. Принципы и процедура анализа

3 Оборудование и реактивы

- 3.1. Оборудование
- 3.2. Реактивы и материалы
- 3.3. Набор ИФА на интерлейкин-6
- 3.4. Программное обеспечение
- 3.5. Важные замечания

4 Процедура анализа

- 4.1. Подготовка стандартов эндотоксина
- 4.2. Подготовка неэндотоксиновых контролей
- 4.3. Подготовка испытуемых препаратов
- 4.4. Подготовка культуральной среды
- 4.5. Подготовка раствора моноцитов
- 4.6. Анализ испытуемых образцов методом ИФА на интерлейкин-6

5 Анализ образцов на содержание пирогенных веществ

- 5.0. Предварительные испытания
- 5.1. Метод А
- 5.2. Метод В
- 5.3. Метод С

I. Состав набора и условия хранения

1.1 Моноциты

Наименование	Содержание	Количество	Температура хранения
Моноциты	Криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК)	1 флакон	-80°C или ниже

1.2 Набор MAT Research

Наименование	Содержание	Количество	Температура хранения
Культуральная среда	RPMI	45 мл	+4°C
Добавка к культуральной среде	Фетальная бычья сыворотка	5 мл	-20°C
96-ти луночный стерильный плоскодонный планшет	Стерильный 96-ти луночный планшет в индивидуальной упаковке	1 шт.	Комнатная температура
96-ти луночный планшет с U-образным дном	Нестерильный планшет без индивидуальной упаковки	1 шт.	Комнатная температура
Готовый набор ИФА на интерлейкин-6	Реактивы и планшет с нанесенными антителами	1 набор	+4°C
Стандарт интерлейкина-6	Рекомбинантный интерлейкин-6	1 шт.	-20°C

1.3 Референсный стандарт эндотоксина и неэндотоксиновые пирогеновые контроли

Наименование	Содержание	Количество	Температура хранения
Референсный стандарт эндотоксина	Липополисахарид EDQM (2000 ЕЭ/мл)	50 мкл	-20°C
Неэндотоксиновый пирогеновый контроль	LTA (липoteйхоевая кислота)	50 мкл	-20°C
Неэндотоксиновый пирогеновый контроль	HKSA (термоинкаптивированный золотистый стафилококк)	50 мкл	-20°C
Неэндотоксиновый пирогеновый контроль	Флагеллин (не обязательно)	50 мкл	-20°C

2. Введение

2.1 Общие сведения

Лекарственные препараты могут содержать пирогены, источниками которых могут являться бактерии, вирусы, грибы, также пирогены могут быть побочными продуктами производственного процесса. Контаминация лекарственных препаратов пирогенными веществами является серьезной угрозой для здоровья пациентов и может приводить к развитию лихорадки и, в конечном итоге, может вызвать шок и смерть. В настоящее время для определения содержания пирогенных веществ (бактериальных эндотоксинов и веществ неэндотоксиновой природы) используется анализ «Пирогенность», проводимый на кроликах, который неточен и наносит вред животным. MAT Research предлагает готовый набор для проведения теста на активацию моноцитов (MAT), который обладает более высокой чувствительностью и не требует использования животных.

2.2 Принципы и процедура анализа

Тест на активацию моноцитов (MAT) был разработан и валидирован как метод определения и количественной оценки бактериальных эндотоксинов и пирогенов неизвестной природы, которые активируют человеческие моноциты, что приводит к высвобождению эндогенных медиаторов. MAT Research использует в качестве источника моноцитов криоконсервированные моноклеарные клетки периферической крови человека, что позволяет определять минимальные количества пирогенных веществ. Тест проводится путем инкубирования свежеразмороженных моноцитов с растворами испытуемых препаратов в течение суток, а затем измеряется выделенный интерлейкин-6, служащий показателем активации моноцитов, вызванной пирогенами. В качестве стандарта для бактериальных эндотоксинов используется липополисахарид (ЛПС), полученный из Грамм-отрицательных бактерий, его содержание выражено в международных единицах эндотоксина. В качестве неэндотоксиновых контролей используются липотейхоевая кислота и термоинактивированный золотистый стафилококк.

3. Оборудование и реактивы

3.1 Оборудование:

- Ламинарный бокс
- CO₂ - инкубатор (37°C, 5% CO₂)
- Водяная баня (37°C)
- Вортекс
- Одноканальные и многоканальные дозаторы объемом от 5 до 1000 мкл

3.2 Материалы:

- Апирогенные пробирки объемом 50 мл, 15 мл и 2 мл
- Стерильные апирогенные наконечники
- Стерильные плоскодонные 96-ти луночные планшеты (включены в набор)
- Нестерильные плоскодонные 96-ти луночные планшеты (включены в набор)
- Апирогенные стерильные одноразовые пипетки
- Стерильные резервуары для реактивов
- Лабораторная посуда для приготовления реактивов
- Этанол (70%)

3.3 Набор ИФА на интерлейкин-6

- Концентрация интерлейкина-6 в отобранном супернатанте определяется с помощью иммуноферментного анализа с расширенным диапазоном определяемых концентраций интерлейкина-6 (10-3160 пг/мл). Реактивы для проведения ИФА входят в состав набора.

3.4. Программное обеспечение:

- SoftMax Pro или сравнимая альтернатива.

3.5 Важные замечания

- Всегда выполняйте анализ в ламинаре.
- Используйте стерильные и апиrogenные материалы и оборудование.
- Регулярно обрабатывайте поверхности 70% этанолом.
- Используйте защитные перчатки и халат.

4. Процедура анализа

Анализ должен проводиться в стерильных условиях, все реактивы и материалы должны быть стерильными и апирогенными.

4.1 Подготовка стандартов эндотоксина (ЛПС)

Для построения калибровочной кривой стандартов эндотоксина используется липополисахарид E.Coli производства EDQM, откалиброванный в международных единицах эндотоксина (МЕ).

1. Разморозьте флакон с липополисахаридом.
2. Добавьте во флакон 950 мкл среды RPMI для получения раствора ЛПС с концентрацией 100 МЕ/мл.

ВНИМАНИЕ

Для подготовки разведений контрольного стандарта эндотоксина используется среда RPMI без ФБС.

3. Перемешайте раствор на вортексе не менее 3-х минут на высоких оборотах.
4. Подпишите пробирку на 15 мл R1. В данной пробирке будет получен раствор эндотоксина с концентрацией 2 МЕ/мл.
5. В пробирку R1 внесите 2940 мкл среды RPMI.
6. Подпишите пробирки на 2 мл: R2 – R7. Внесите в каждую пробирку по 500 мкл среды RPMI.
7. Перенесите 60 мкл исходного раствора ЛПС с концентрацией 100 МЕ/мл в пробирку R1 к 2940 мкл среды RPMI для получения раствора ЛПС с концентрацией 2 МЕ/мл (R1).

ВНИМАНИЕ

Объем раствора R1 может быть увеличен в зависимости от количества испытуемых препаратов и метода испытания.

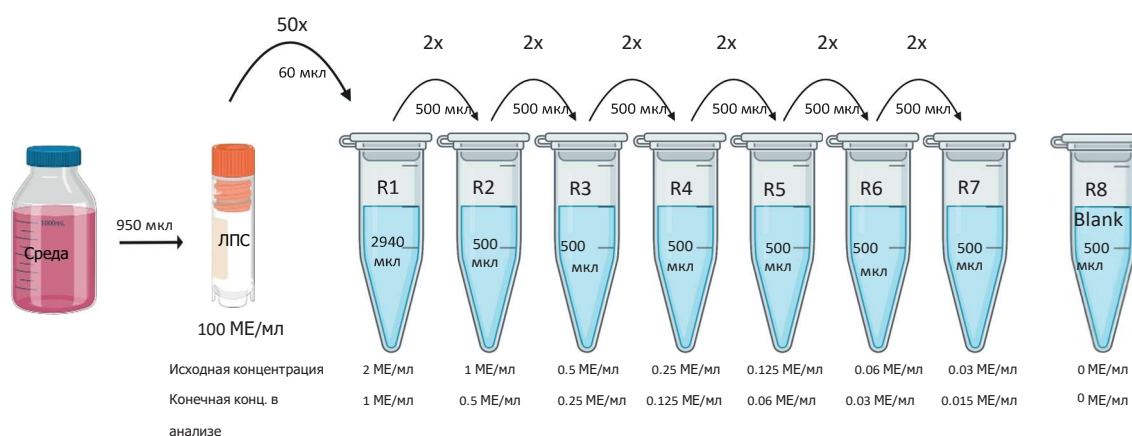
9. Перемешайте полученный раствор не менее 60 секунд.
10. Перенесите 500 мкл раствора из пробирки R1 в пробирку R2 и интенсивно перемешайте на вортексе не менее 60 секунд.
11. Перенесите 500 мкл раствора из пробирки R2 в пробирку R3 и интенсивно перемешайте на вортексе не менее 60 секунд. Повторите данную процедуру для пробирок R3 - R7.

ВНИМАНИЕ

Схема приготовления стандартов эндотоксина показана на рис. 1

12. По 100 мкл каждого раствора в 4-х повторностях используется в анализе для получения конечной концентрации от 0,015 до 1,0 МЕ/мл.

Рис. 1. Подготовка стандартов эндотоксина

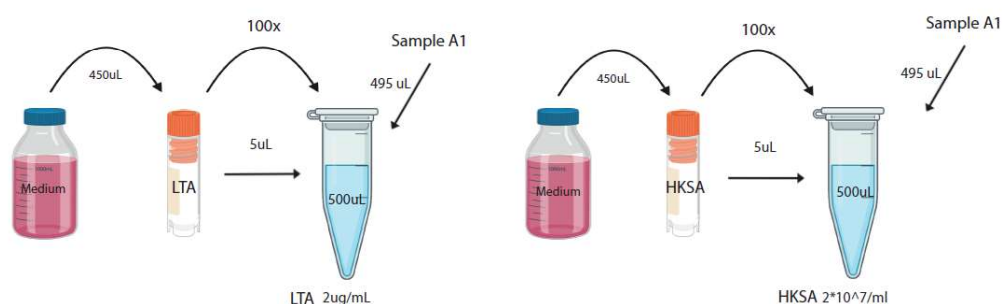


4.2 Подготовка неэндотоксиновых контролей

В качестве неэндотоксиновых пирогеновых контролей используются LTA и HKSA.

13. Разморозьте флакон с LTA.
14. Внесите во флакон 450 мкл среды RPMI для того, чтобы получить исходный раствор с концентрацией 200 мкг/мл.
15. Разморозьте флакон с HKSA.
16. Внесите во флакон 450 мкл среды RPMI для того, чтобы получить исходный раствор с концентрацией $2 \cdot 10^9$ /мл.
17. Перемешайте растворы на вортексе не менее 60 секунд.
18. Приготовьте неэндотоксиновые контроли, добавив 5 мкл каждого исходного раствора к 495 мкл раствора испытуемого препарата (разведение в 100 раз) и перемешайте на вортексе (рисунок 2).

Рис. 2. Подготовка неэндотоксиновых контролей



4.3 Подготовка планшета для анализа

- 19.** Подготовьте необходимые разведения испытуемого препарата в среде RPMI (см. раздел 5) и внесите по 100 мкл каждого разведения в четырех повторностях на 96-ти луночный планшет.

ВНИМАНИЕ

Для подготовки разведений испытуемого препарата используется среда RPMI без ФБС.

- 20.** Внесите на планшет по 100 мкл каждого разведения растворов эндотоксина и неэндотоксиновых контролей в четырех повторностях.
- 21.** Внесите по 100 мкл среды RPMI в четырех повторностях в качестве отрицательного контроля.

4.4 Подготовка культуральной среды

Культуральная среда состоит из среды RPMI, обогащенной фетальной бычьей сывороткой (ФБС) (10%). Данная культуральная среда используется для разведения, отмывки и ресуспендирования МКПК. Следующие шаги описывают приготовление культуральной среды.

- 22.** Разморозьте флакон с ФБС.
- 23.** Перенесите 20 мл среды RPMI в стерильную пробирку объемом 50 мл.
- 24.** Добавьте все содержание флакона с ФБС (± 5 мл) к пробирке и осторожно перемешайте, чтобы получить раствор с 10% ФБС в среде RPMI.

ВНИМАНИЕ

Используйте культуральную среду, предварительно прогретую на водяной бане до 37°C.

4.5 Подготовка суспензии моноцитов

Последний подготовительный этап в анализе – это подготовка суспензии моноцитов. Следующие шаги описывают этот процесс, начиная с того момента, как клетки будут извлечены из морозильной камеры, и до этапа добавления клеток на планшет.

ВНИМАНИЕ

Для подготовки клеток используется культуральная среда RPMI с ФБС.

- 25.** Достаньте флакон с моноцитами из емкости с жидким азотом или из контейнера с сухим льдом. Разморозьте клетки, немедленно поместив флакон в водяную баню при температуре 37°C до тех пор, пока не исчезнут последние видимые кристаллы льда.
- 26.** Сразу же перенесите размороженные моноциты (± 1 мл) из флакона в стерильную апиrogenную пробирку объемом 50 мл.
- 27.** Медленно добавьте в пробирку 9 мл предварительно прогретой до 37°C культуральной среды (1 мл в течение 5 секунд) и перемешивайте плавным покачиванием пробирки во время добавления культуральной среды для того, чтобы получить гомогенную клеточную суспензию.
- 28.** Отмойте моноциты в предварительно прогретой до 37°C культуральной среде путем центрифугирования при 330 x g в течение 10 минут на роторной центрифуге. Удалите супернатант, не повреждая клеточный осадок.
- 29.** Ресуспенсируйте клетки в 10 мл прогретой до 37°C культуральной среде. Перемешайте суспензию с клетками и аккуратно внесите по 100 мкл во все лунки планшета, содержащие испытуемые растворы, стандарты эндотоксина, неэндотоксиновые контроли и отрицательные контроли. Используйте многоканальный дозатор.

ВНИМАНИЕ Убедитесь, что клеточная суспензия гомогенна, чтобы каждая лунка содержала одинаковое количество клеток.

- 30.** Поместите 96-ти луночный планшет в CO₂-инкубатор на 20 \pm 2 часа.

4.6 Анализ образцов с помощью ИФА

ПОДГОТОВКА

- Перед началом ИФА дайте планшетам и реактивам прогреться до комнатной температуры (кроме ТМБ субстрата).
- Добавьте 50 мл концентрата промывочного буфера к 950 мл дистиллированной воды.

ВНИМАНИЕ

Для точного выполнения анализа все образцы должны быть разведены как минимум в два раза буфером для разведения.

Для помощи в расчете правильного разведения обратитесь в службу технической поддержки MAT Research.

31. Промойте лунки планшета ИФА 3 раза по 300 мкл промывочным буфером. После последней промывки переверните планшет и постучите по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ

Сразу же приступайте к следующему этапу. Не позволяйте лункам высохнуть.

32. Добавьте в лунки планшета предварительно разведенный супернатант стандартов эндотоксина, испытуемых растворов, неэндотоксиновых контролей и отрицательных контролей (по 100 мкл в лунку).

33. Закройте планшет адгезивной пленкой и инкубируйте в течение 2-х часов при комнатной температуре. Рекомендуется использовать шейкер для микропланшетов.

ВНИМАНИЕ

За 15 минут до выполнения следующего шага подготовьте рабочий раствор антител к интерлейкину, добавив 12 мкл биотинилированных антител к интерлейкину к 12 мл буфера для разведения.

34. Промойте лунки планшета ИФА 4 раза по 300 мкл промывочным буфером. После последней промывки переверните планшет и постучите по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ

Сразу же приступайте к следующему этапу. Не позволяйте лункам высохнуть.

35. Добавьте по 100 мкл раствора антител к интерлейкину в каждую лунку и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре. Рекомендуется использовать шейкер для микропланшетов.

ВНИМАНИЕ

За 15 минут до выполнения следующего шага подготовьте раствор конъюгата (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена), добавив 12 мкл концентрата конъюгата к 12 мл буфера для разведения конъюгата.

36. Промойте лунки планшета ИФА 4 раза по 300 мкл промывочным буфером. После последней промывки переверните планшет и постучите по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ

Сразу же приступайте к следующему этапу. Не позволяйте лункам высохнуть.

37. Добавьте по 100 мкл раствора конъюгата в каждую лунку и инкубируйте в течение 1 часа при комнатной температуре.

Рекомендуется использовать шейкер для микропланшетов.

- 38.** Промойте лунки планшета ИФА 4 раза по 300 мкл промывочным буфером. После последней промывки переверните планшет и постучите по фильтровальной бумаге.

ВНИМАНИЕ

Сразу же приступайте к следующему этапу. Не позволяйте лункам высохнуть.

- 39.** Добавьте по 100 мкл ТМБ-субстрата в каждую лунку и инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
- 40.** Добавьте по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку, чтобы остановить реакцию.
- 41.** Измерьте оптическую плотность в одноволновом режиме при длине волны 450 нм в течение 15 минут после добавления стоп-реагента. Если возможно, измерьте оптическую плотность при двухволновом режиме (при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 570 - 630 нм).

5. Анализ на пирогенные вещества

Предварительные испытания

Испытание на Мешающие факторы

Для того, чтобы убедиться в достоверности результатов анализа, для каждого нового препарата необходимо провести предварительную валидацию методики. Данная валидация показывает, что испытуемый раствор не оказывает влияния на измерительную систему, и в анализе будут определяться возможные эндотоксины и пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов.

Используя соответствующий растворитель, в геометрической прогрессии делают ряд разведений ЛС, таким образом, чтобы они не превышали МДР испытуемого ЛС. Для Метода А готовят такие же разведения испытуемого ЛС, к которым прибавляют стандарт эндотоксина в концентрации, равной или близкой к середине калибровочной кривой), а для Метода В – равные удвоенному значению ПО (предел определения метода).

Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания измеренная концентрация добавленного стандарта эндотоксина в испытуемый раствор составляет 50-200% от известной концентрации добавленного эндотоксина. Если испытание не отвечает этому критерию, испытание следует провести Методом С

В зависимости от проводимого метода, определяются разные значения фактора разведения препарата.

Фактор разведения f для методов А и В – это наибольшая концентрация препарата (наименьшее разведение препарата), для которого определенная концентрация эндотоксина находится в пределах 50-200% от добавленной концентрации эндотоксина. Данное разведение определяется при валидации препарата.

Для метода А:

$2xf$ – двукратное разведение препарата в разведении f , не превышающее значения МДР.

$4xf$ - двукратное разведение препарата в разведении $2xf$, не

превышающее значения МДР.

Для метода В:

f_1 – раствор препарата в выбранном разведении, не превышающем значения МДР. Кратность раствора конкретного ЛС выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР/2.

f_2 – раствор препарата в выбранном разведении, не превышающем значения МДР. Кратность раствора конкретного ЛС выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР.

Для метода С:

f_1 , f_2 и f_3 - разведения испытуемого препарата, определенные для контрольной серии в испытании на мешающие факторы.

Максимально допустимое разведение (МДР) рассчитывается по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПКПВ} \cdot \text{КИР}}{\text{ПО}}$$

ПКПВ – предельная концентрация ПВ, которая выражается в эквиваленте единиц эндотоксина (ЭЕЭ) на миллиграмм или миллилитр или в единицах биологической активности лекарственного препарата (ЛП) и является критерием приемлемости для принятия положительного или отрицательного решения;

КИР – концентрация испытуемого раствора, т.е. концентрация ЛС или действующего вещества, для которого указано ПКПВ.

ПО - предел обнаружения, это концентрация БЭ, соответствующая пороговому значению, которая определяется с использованием калибровочной кривой стандарта эндотоксина или с серией ЛС, утвержденной в качестве контрольной, и выражается в ЭЕЭ/мл. Один ЭЕЭ стимулирует выделение такого же количества IL-1 β , IL-6, TNF α , что и одна единица эндотоксина (ЕЭ).

Для расчета предельного содержания ПВ используют формулу (ОФС

«Бактериальные эндотоксины»): $\text{ПКПВ} = \frac{K}{M}$,

где:

K – пороговая пирогенная доза БЭ, выраженная на кг массы тела человека.

M – максимальная терапевтическая доза испытуемого ЛП, вводимая в течение одного часа на 1 кг массы тела.

Испытание на Мешающие факторы в системе определения интерлейкина-6

После подбора оптимального разведения раствора испытуемого ЛС для дальнейшего исследования проводят проверку его отрицательного влияния на результаты методики измерения маркера (интерлейкина-6.) Для этого готовят серию разведений стандарта интерлейкина-6 в присутствии и отсутствии испытуемого препарата в разведении, для которого проводилось испытание на мешающие факторы. Различие в определяемых концентрациях серий разведений стандарта интерлейкина-6 в присутствии и отсутствии испытуемого ЛС должно находиться в диапазоне $\pm 20\%$.

5.1 Метод А: Количественное испытание

В методе А проводится сравнение полученных результатов испытуемого ЛС с данными калибровочной кривой концентраций стандарта эндотоксина. Концентрация ПВ в испытуемом ЛС не должна превышать величину предельного содержания ПВ. Готовят три разведения испытуемого препарата – А, В и С.

Раствор А - раствор испытуемого ЛС в наименьшем разведении, для которого концентрация эндотоксина находится в пределах от 50 до 200 % Фактор разведения – f .

Раствор В – двукратный раствор раствора А, не превышающий значение МДР. Фактор разведения - $2xf$.

Раствор С - двукратный раствор раствора В, не превышающий значение МДР. Фактор разведения - $4xf$.

Для каждого разведения готовят положительный контроль препарата, содержащий эндотоксин в конечной концентрации R3 (после смешивания с клетками).

Максимальное количество испытуемых препаратов на планшете: 2

Диапазон концентраций эндотоксина: 0.0 - 1.0 ЕЭ/мл

Неэндотоксиновые контроли: HKSA и LTA

Рекомендованное расположение растворов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R1	R1	R1	R1	A1	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A2
B	R2	R2	R2	R2	B1	B1	B1	B1	B2	B2	B2	B2
C	R3	R3	R3	R3	C1	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C2
D	R4	R4	R4	R4	AS1	AS1	AS1	AS1	AS2	AS2	AS2	AS2
E	R5	R5	R5	R5	BS1	BS1	BS1	BS1	BS2	BS2	BS2	BS2
F	R6	R6	R6	R6	CS1	CS1	CS1	CS1	CS2	CS2	CS2	CS2
G	R7	R7	R7	R7	AS1 LTA	AS1 LTA	AS1 LTA	AS1 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA
H	blank	blank	blank	blank	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA

R1-7: Серия разведений стандарта эндотоксина

Blank: Отрицательный контроль

A1-2: Разведения препаратов с фактором разведения f

AS1-2: Разведения препаратов с фактором разведения f с добавлением эндотоксина в концентрации, равной R3

B1-2: Разведения препаратов с фактором разведения $2xf$

BS1-2: Разведения препаратов с фактором разведения $2xf$ с добавлением эндотоксина в концентрации, равной R3

C1-2: Разведения препаратов с фактором разведения $4xf$

CS1-2: Разведения препаратов с фактором разведения $4xf$ с добавлением эндотоксина в концентрации, равной R3

AS1-2 LTA: Разведения препаратов с фактором разведения f с добавлением LTA

AS1-2 HKSA: Разведения препаратов с фактором разведения f с добавлением HKSA

5.2 Метод В: Полуколичественное испытание

При испытании методом В проводится сравнение испытуемого ЛС со стандартом эндотоксина. Концентрация ПВ в испытуемом ЛС должна быть меньше предельного содержания пирогенов. Готовят три разведения испытуемого препарата – А, В и С. Для принятия решения используют раствор А, если не предусмотрено иное.

Раствор А - раствор ЛС в разведении, при котором было проведено испытание на мешающие факторы Фактор разведения – f .

Раствор В – раствор ЛС в разведении, не превышающем МДР. Кратность раствора конкретного ЛС выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР/2. Фактор разведения - f_1 .

Раствор С - раствор ЛС в разведении, не превышающем МДР. Кратность раствора конкретного ЛС выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР. Фактор разведения – f_2 .

Для каждого разведения готовят положительный контроль препарата, содержащий эндотоксин в конечной концентрации, равной ПОх2 (после смешивания с клетками).

Максимальное количество испытуемых препаратов на планшете: 3

Диапазон концентраций эндотоксина: 0.0 - 1.0 ЕЭ/мл

Неэндотоксиновые контроли: не требуются

Рекомендованное расположение растворов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R1	R1	R1	R1	B1	B1	B1	B1	C2	C2	C2	C2
B	R2	R2	R2	R2	BS1	BS1	BS1	BS1	CS2	CS2	CS2	CS2
C	R3	R3	R3	R3	C1	C1	C1	C1	A3	A3	A3	A3
D	R4	R4	R4	R4	CS1	CS1	CS1	CS1	AS3	AS3	AS3	AS3
E	R5	R5	R5	R5	A2	A2	A2	A2	B3	B3	B3	B3
F	blank	blank	blank	blank	AS2	AS2	AS2	AS2	BS3	BS3	BS3	BS3
G	A1	A1	A1	A1	B2	B2	B2	B2	C3	C3	C3	C3
H	AS1	AS1	AS1	AS1	BS2	BS2	BS2	BS2	CS3	CS3	CS3	CS3

- R1:** Стандарт эндотоксина в концентрации 0.5 x ПО используемой системы
- R2:** Стандарт эндотоксина в концентрации 1 x ПО используемой системы
- R3:** Стандарт эндотоксина в концентрации 2 x ПО используемой системы
- R4:** Стандарт эндотоксина в концентрации 4 x ПО используемой системы
- R5:** Стандарт эндотоксина в концентрации 8 x ПО используемой системы
- Blank:** Отрицательный контроль
- A1-3:** Разведения препаратов с фактором разведения f
- AS1-3:** Разведения препаратов с фактором разведения f с добавлением стандарта эндотоксина в концентрации 2x ПО используемой системы
- B1-3:** Разведения препаратов с фактором разведения f_1
- BS1-3:** Разведения препаратов с фактором разведения f_1 с добавлением стандарта эндотоксина в концентрации 2x ПО используемой системы
- C1-3:** Разведения препаратов с фактором разведения f_2
- CS1-3:** Разведения препаратов с фактором разведения f_2 с добавлением стандарта эндотоксина в концентрации 2x ПО используемой системы

5.3 Метод С: Сравнительное испытание с серией ЛС, утвержденной в качестве стандартной

При использовании метода С проводится сравнение испытуемого ЛС (L) с серией ЛС, утвержденной в качестве контрольной (R). Контрольная серия выбирается в соответствии с обоснованными и утвержденными критериями. Готовят три разведения f_1 f_2 f_3 испытуемого препарата и три разведения f_1 f_2 f_3 серии ЛС, утвержденной в качестве контрольной – А, В и С. Кратность разведений f_1 f_2 f_3 определяют в испытании контрольной серии на мешающие факторы.

Максимальное количество испытуемых препаратов на планшете: 3

Ряд разведений стандартов эндотоксина – не требуется

Неэндотоксиновые контроли: не требуются

Рекомендованное расположение растворов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	blank	blank								
B	LPS control	LPS control	LPS control	LPS control								
C	AR1	AR1	AR1	AR1	AR2	AR2	AR2	AR2	AR3	AR3	AR3	AR3
D	BR1	BR1	BR1	BR1	BR2	BR2	BR2	BR2	BR3	BR3	BR3	BR3
E	CR1	CR1	CR1	CR1	CR2	CR2	CR2	CR2	CR3	CR3	CR3	CR3
F	AL1	AL1	AL1	AL1	AL2	AL2	AL2	AL2	AL3	AL3	AL3	AL3
G	BL1	BL1	BL1	BL1	BL2	BL2	BL2	BL2	BL3	BL3	BL3	BL3
H	CL1	CL1	CL1	CL1	CL2	CL2	CL2	CL2	CL3	CL3	CL3	CL3

Blank:	отрицательный контроль
LPS control:	положительный контроль
AR1-3:	Раствор контрольной серии в разведении f_1
BR1-3:	Раствор контрольной серии в разведении f_2
CR1-3:	Раствор контрольной серии в разведении f_3
AL1-3:	Раствор испытуемой серии в разведении f_1
BL-3:	Раствор испытуемой серии в разведении f_2
CL1-3:	Раствор испытуемой серии в разведении f_3