

iBET™ Набор для кинетического турбидиметрического анализа**Инструкция по использованию****КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР**

КТА100ТА, КТА100ТВ, КТА300ТА, КТА300ТВ, КТА400ТА, КТА400ТВ

НАЗНАЧЕНИЕ

iBET™ Набор для кинетического турбидиметрического анализа предназначен для *in vitro* определения эндотоксинов (липополисахаридов) грам-отрицательных бактерий с использованием кинетического турбидиметрического метода. Описанная ниже процедура анализа соответствует требованиям Общей фармакопейной статьи 2.6.14 «Бактериальные эндотоксины» Европейской Фармакопеи и Общей фармакопейной статьи <85> «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Только для использования *in vitro*. Не предназначен для диагностики эндотоксемии у человека.

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Кинетический турбидиметрический тест – это количественный метод определения эндотоксинов грам-отрицательных бактерий. Анализ проводят путем смешивания ЛАЛ-реактива с раствором испытуемого образца, после чего измеряют оптическую плотность реакционной смеси при определенной длине волны при температуре 37°C. Скорость увеличения оптической плотности зависит от концентрации эндотоксинов в образце. Быстрое увеличение оптической плотности свидетельствует о высоком содержании эндотоксинов, в то время как медленное увеличение показывает низкое содержание эндотоксинов в образце. Таким образом, по скорости увеличения оптической плотности определяют концентрацию эндотоксинов в образце.

ПРИНЦИПЫ

В основе кинетического турбидиметрического анализа лежит специфическая биохимическая реакция между бактериальными эндотоксинами и лизатом амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ), объединенная с измерением скорости изменения мутности для определения уровня эндотоксинов.

ЛАЛ-реактив, получаемый из амебоцитов американского мечехвоста *Limulus polyphemus*, содержит каскад проферментов и свертывающих белков, которые высокочувствительны к бактериальным эндотоксинам. Когда в образце присутствуют эндотоксины, они инициируют серию ферментативных реакций в ЛАЛ-реактиве: эндотоксины связываются в ЛАЛ-реактиве с проферментом, активируя его. Данная активация запускает серию протелитических реакций, в конце концов превращая растворимый белок в ЛАЛ-реактиве в нерастворимый белок, образующий гель. По мере протекания ферментативной реакции накапливаются нерастворимые белковые комплексы, вызывая увеличение мутности реакционной смеси.

В анализе измеряется скорость увеличения данной мутности при температуре 37°C.

Оптическая плотность записывается через равные промежутки времени при определенной длине волны (например, 340 нм). Скорость увеличения оптической плотности положительно коррелирует с концентрацией эндотоксинов. Другими словами, время (начальное время), необходимое для достижения определенного значения оптической плотности (начальная ОП) отрицательно коррелирует с концентрацией эндотоксинов. На основании этой зависимости можно измерить концентрацию эндотоксинов в образце.

РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. ЛАЛ-реактив

Лизат амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ-реактив) получают из американских мечехвостов *Limulus polyphemus*. В процессе производства реактива активность фактора G была остановлена. Таким образом, реактив не взаимодействует с глюкозами и может использоваться для определения эндотоксинов в присутствии глюкозана.

Предел определения метода для каталожных номеров КТА100ТА/КТА300ТА/КТА400ТА составляет 0,01 ЕЭ/мл, для каталожных номеров КТА100ТВ/КТА300ТВ/КТА400ТВ – 0,005 ЕЭ/мл. Чувствительность (λ) кинетического турбидиметрического ЛАЛ-реактива – это самая низкая точка на стандартной кривой.



SHANGHAI BETMAT BIOTECHNOLOGY Ltd.

Восстановите ЛАЛ-реактив с помощью **буфера для восстановления**, объем для восстановления указан на этикетке. Восстановленный ЛАЛ-реактив должен быть использован в течение 10 минут. Если восстановленный ЛАЛ-реактив заморозить сразу же после разведения при температуре ниже -20°C, он сохраняет свою стабильность до одного месяца. Не замораживать – размораживать более одного раза.

2. Буфер для восстановления

Буфер для восстановления предназначен для восстановления кинетического турбидиметрического ЛАЛ-реактива. Перед использованием необходимо дать буферу прогреться до комнатной температуры.

3. Контрольный стандарт эндотоксина

Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ) используется для подготовки контролей и для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива. Активность КСЭ указана в сертификате анализа.

4. Вода для ЛАЛ-теста (не включена в наборы с каталожными номерами КТА300ТА и КТА300ТВ).

В ЛАЛ-тесте используется вода, свободная от эндотоксинов. Концентрация эндотоксинов в воде для ЛАЛ-теста, входящей в наборы, составляет <0.005 ЕЭ/мл.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Хранить при температуре 2–8°C. Хранить вдали от яркого света.

ТРЕБУЕМЫЕ РЕАКТИВЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. Вода для ЛАЛ-теста

Вода для ЛАЛ-теста не включена в наборы с каталожными номерами КТА300ТА и КТА300ТВ. Концентрация эндотоксинов в воде для ЛАЛ-теста должна быть <0.005 ЕЭ/мл.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. Стеклопипетки асептические для подготовки разведений стандартов эндотоксина.

2. Дозаторы с апиrogenными наконечниками.
3. Апиrogenные 96-ти луночные планшеты.
4. Многоканальный дозатор с апиrogenными резервуарами для реактивов (опционно).
5. Микропланшетный ридер с инкубатором с фильтром на 340 нм и программным обеспечением для кинетического анализа.

Внимание: вместо микропланшетного ридера также может быть использован пробирочный ридер с инкубатором. Пробирочный ридер определяет изменения в пропускании света при 340 нм. Необходимо подтвердить параметры установки для пробирочного ридера. В данной инструкции в качестве примера приведен микропланшетный ридер. При использовании пробирочного ридера реакционная смесь помещается в стеклянные апиrogenные пробирки.

6. Вортекс.
7. Штатив для пробирок.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Все материалы, которые контактируют с образцами или реактивами, должны быть свободными от эндотоксинов. Термостабильные материалы (например, стеклянная посуда) должны быть депиrogenизированы путем нагревания в сухожаровом шкафу при температуре 250°C или выше не менее 30 минут. Лабораторный пластик, такой как микропланшеты и наконечники, должен быть апиrogenным и не должен оказывать влияния на анализ. Во время проведения анализа следует использовать асептическую технику работы.

1. Подготовка образца.

- Используя воду для ЛАЛ-теста, подготовьте растворы испытуемого образца путем растворения или разведения лекарственного средства.
- Хранение образцов: образцы должны храниться в условиях, останавливающих бактериологическую активность. Для кратковременного хранения (24 часа и менее) рекомендуется хранить образцы при температуре 2–8°C. Для длительного хранения рекомендуется заморозить образцы при температуре -10°C и ниже.
- pH испытуемого образца: реакция ЛАЛ-реактива с эндотоксином оптимально

протекает в диапазоне значений pH 6,0 – 8,0. В случае необходимости доведите значение pH испытуемого образца (или его разведения) таким образом, чтобы значение pH смеси ЛАЛ-реактива и испытуемого образца лежало в диапазоне 6,0 – 8,0. Для доведения значения pH можно использовать апирогенные растворы 0,1 N натрия гидроксида, 0,1 N хлороводородной кислоты или апирогенный трис-буфер.

- Анализ на мешающие факторы: образцы могут содержать факторы, которые оказывают влияние на реакцию ЛАЛ-реактива с эндотоксином. Перед анализом на эндотоксины необходимо провести валидацию, подтверждающую отсутствие ингибирования/усиления реакции.

2. Подготовка растворов стандарта эндотоксина.

Подготовьте серию десятикратных разведений эндотоксина путем разведения Контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ).

Сначала приготовьте исходный раствор стандарта эндотоксина. Для этого добавьте воду для ЛАЛ-теста для растворения КСЭ, количество воды для ЛАЛ-теста указано в сертификате анализа. Перемешайте на вортексе не менее 5 минут для получения исходного раствора стандарта эндотоксина. После интенсивного перемешивания исходного раствора стандарта эндотоксина подготовьте рабочие растворы эндотоксина с концентрациями 10, 1, 0,1, 0,01 ЕЭ/мл или 5, 0,5, 0,05, 0,005 ЕЭ/мл, используя воду для ЛАЛ-теста. Каждое разведение следует перемешивать на вортексе не менее 60 секунд перед переходом к следующему разведению. Для предотвращения потери активности из-за адсорбции готовьте данные растворы непосредственно перед использованием.

Внимание:

- Для наборов с каталожными номерами КТА100ТА, КТА300ТА и КТА400ТА анализ был оптимизирован с использованием стандартной кривой с концентрациями эндотоксина 10, 1, 0,1, 0,01 ЕЭ/мл. Пользователь может выбрать другие концентрации эндотоксина в диапазоне от 100 до 0,01 ЕЭ/мл.
- Для наборов с каталожными номерами КТА100ТВ, КТА300ТВ и КТА400ТВ анализ был оптимизирован с использованием стандартной кривой с концентрациями эндотоксина 5, 0,5, 0,05, 0,005 ЕЭ/мл. Пользователь может выбрать другие концентрации эндотоксина в диапазоне от 50 до 0,005 ЕЭ/мл.

3. Подготовка микропланшетного ридера и программного обеспечения.

Установите температуру ридера на 37°C и начните прогрев. В программе установите считывание в кинетике при длине волны 340 нм с интервалами измерения ОП каждые 30 секунд в течение 100 минут. Для расчета начального времени установите значение onset OD равным 0,03. Установите скорость перемешивания как среднюю в течение 5 секунд перед началом считывания.

4. Преинкубирование планшета (опционно).

После того, как ридер прогреется до температуры 37°C, поместите апиогенный планшет в ридер для предварительного прогрева в течение 10 минут. Данный этап необходим в случае, когда температура в помещении составляет ниже 15°C.

5. Подготовка ЛАЛ-реактива.

Восстановите каждый флакон ЛАЛ-реактива, добавив во флакон указанное на этикетке количество **буфера для восстановления**. Перемешайте осторожно, но тщательно до полного растворения ЛАЛ-реактива. Не перемешивайте на вортексе, так как содержимое флакона может запениться.

Внимание:

- Буфер для восстановления и ЛАЛ-реактив перед использованием должны быть прогреты до комнатной температуры.
- Восстановленный ЛАЛ-реактив должен быть использован в течение 15 минут.
- Если лизат заморозить сразу же при температуре $\leq -20^{\circ}\text{C}$, он сохраняет свою стабильность до одного месяца.
- Восстановленный ЛАЛ-реактив может быть заморожен и разморожен только один раз.

6. Поместите реактивы и испытуемые растворы в планшет. Каждая реакционная смесь содержит 0,1 мл ЛАЛ-реактива и 0,1 мл испытуемого раствора. Перед внесением в планшет перемешайте растворы стандартов эндотоксина и испытуемых образцов в течение 60 секунд. Внесите по 0,1 мл контролей, растворов стандарта эндотоксина или растворов испытуемых образцов в соответствующие лунки планшета. Вносить растворы следует, начиная с отрицательного контроля (в качестве отрицательного контроля используется вода для ЛАЛ-теста), затем следуя от самой низкой

концентрации эндотоксина к самой высокой. Анализ проводится как минимум в двух повторностях. Затем внесите в каждую лунку по 0,1 мл восстановленного ЛАЛ-реактива. Избегайте образования пузырей.

Опционно: перенесите весь ЛАЛ-реактив в резервуар для реактивов, хорошо перемешайте, покачивая резервуар из стороны в сторону. Использование многоканального дозатора для внесения ЛАЛ-реактива по 0,1 мл в каждую лунку планшета позволит увеличить скорость дозирования.

7. Оставьте планшет без крышки. Поместите планшет в кинетический ридер с инкубатором. Начните программу считывания с этапа перемешивания на средней скорости в течение 5 секунд перед началом считывания для полного перемешивания реакционных смесей.
8. Программное обеспечение записывает значения ОП при 340 нм каждые 30 секунд в течение 100 минут и автоматически рассчитывает результаты.

ДАННЫЕ АНАЛИЗА

1. Для каждой лунки программа автоматически рассчитывает значение начального времени, соответствующего значению оптической плотности onset OD.
2. Уравнение стандартной кривой:
$$\log_{10} Y = B(\log_{10} X) + A$$
, где
Y – время реакции (начальное время), X – концентрация эндотоксинов
B – наклон регрессионной кривой, A – пересечение с осью Y.
3. По данным стандартной кривой программа рассчитывает концентрацию эндотоксинов в испытуемых образцах.

ВИД АНАЛИЗА: ВАЛИДАЦИЯ СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Анализ «Валидация стандартной кривой» должен быть проведен при получении каждой новой серии ЛАЛ-реактива. Подготовьте растворы стандарта эндотоксина с концентрациями эндотоксина в диапазоне, указанными в сертификате анализа. Стандартная кривая должна включать как минимум три концентрации эндотоксина, рекомендуется делать десятикратные разведения эндотоксина. Например, если

стандартный диапазон составляет 0,01 – 10 ЕЭ/мл, стандарты эндотоксина могут иметь концентрации 0,01, 0,1, 1 и 10 ЕЭ/мл. При проведении анализа ставьте каждую концентрацию эндотоксина как минимум трех повторностях. Не усредняйте начальное время для повторностей. Абсолютное значение коэффициента корреляции (r) для стандартной кривой должно быть ≥ 0.980 .

ВИД АНАЛИЗА: МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Анализ на мешающие факторы должен проводиться при любых изменениях, которые вероятно могут повлиять на результаты анализа. Это включает, но не ограничивает, изменение состава испытуемого образца или изменение поставщика ЛАЛ-реактива.

- Подготовьте положительный контроль препарата (PPC), который представляет собой раствор испытуемого образца с известным количеством добавленного эндотоксина. Концентрация эндотоксина в положительном контроле (спайке) (λ_m) должна быть близка к середине стандартной кривой. Например, если используется стандартная кривая с концентрациями 0,01 – 10 ЕЭ/мл, используйте для спайка концентрацию эндотоксина 0,1 ЕЭ/мл или 1 ЕЭ/мл.
- Поставьте в анализ образец со спайком и без спайка.
- Определите концентрацию эндотоксина в образце со спайком (C_s) и без спайка (C_t).
- Рассчитайте степень извлечения спайка (R), используя формулу: $R = [(C_s - C_t)/\lambda_m] \times 100\%$.
- Степень извлечения в диапазоне от 50% до 200% указывает на отсутствие мешающих факторов в испытуемом образце. Степень извлечения вне данного диапазона указывает на то, что в испытуемом образце присутствуют мешающие факторы.
- Разведите испытуемый образец или используйте другой метод для уменьшения мешающих факторов. Повторите анализ, используя серию разведений испытуемого образца (разведения не должны превышать Максимально допустимое разведение) до тех пор, пока степень извлечения спайка не попадет в диапазон от 50 до 200%.
- Выберите для рутинных испытаний фактор разведения образца, при котором значение R будет наиболее близким к 100%.

ВИД АНАЛИЗА: РУТИННЫЕ ИСПЫТАНИЯ

В рутинном анализе одновременно в одинаковых условиях проверяются неизвестный образец и стандарты эндотоксина. Концентрация эндотоксина в неизвестном образце рассчитывается путем сравнения со стандартами. Каждая концентрация эндотоксина и неизвестный образец должны проверяться как минимум в двух повторностях. Усредните начальное время для всех повторностей при выполнении расчетов. Пользователь может включить в анализ положительный контроль препарата (РРС) для контроля ингибирования или усиления реакции. (См. ВИД АНАЛИЗА: МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ). Для того, чтобы приготовить раствор образца с концентрацией эндотоксина 1 ЕЭ/мл, добавьте 10 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 10 ЕЭ/мл к 0,1 мл испытуемого образца, при этом концентрация эндотоксина в образце составит 1 ЕЭ/мл

ПОЛИНОМИАЛЬНАЯ РЕГРЕССИЯ

В рутинных анализах для построения калибровочной кривой может использоваться полиномиальная регрессия, если абсолютное значение коэффициента корреляции (r) ≥ 0.980 . Данный метод повышает точность расчета концентрации эндотоксинов на всем диапазоне.

При использовании полиномиальной регрессии для вывода полиномиального уравнения при построении калибровочной кривой берутся десятичные логарифмы значений времени реакции и соответствующие им десятичные логарифмы концентраций эндотоксина. Степень данного полиномиального уравнения определяется числом стандартов эндотоксина, включенных в анализ: это всегда на единицу меньше, чем число стандартов, с максимальной степенью полинома, равной четырем (для анализов с пятью и более стандартами) и минимальной степенью, равной двум (для анализов с тремя стандартами).

Ниже приведен пример полиномиального уравнения четвертой степени:

$$\log_{10}y = A + B(\log_{10} x) + C(\log_{10}x)^2 + D(\log_{10}x)^3 + E(\log_{10}x)^4$$

Полиномиальная регрессия не может использоваться для предварительных анализов, включая ВАЛИДАЦИЮ СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ и АНАЛИЗ МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ.

КРИТЕРИИ АНАЛИЗА

Анализ считается достоверным только при соблюдении следующих условий:

1. Абсолютное значение коэффициента корреляции для стандартной кривой (r) ≥ 0.980 .

2. Время реакции для всех отрицательных контролей больше, чем начальное время для стандарта с наименьшей концентрацией.

Коэффициент вариации (C.V.) рассчитывается как стандартное отклонение реакционного времени, деленное на среднее значение, обычно выражается в процентах. Когда анализ выполняет опытный оператор, значение %C.V. времени реакции для повторностей обычно составляет менее 10%.

МУТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Образцы, которые имеют значительную степень мутности, требуют очистки перед анализом. Очистка может быть достигнута с помощью центрифугирования, фильтрации или разведения.

ССЫЛКИ

1. United States Pharmacopeia. Chapter <85> Bacterial Endotoxins.
2. European Pharmacopoeia. Chapter 2 .6.14 Bacterial Endotoxins
2. United States Pharmacopeia. Chapter 〈1085〉 Guidelines on the Endotoxins Test
3. European Pharmacopoeia. Chapter 5.1.10 Guidelines for Using the Test for Bacterial Endotoxins
5. U.S. Food and Drug Administration. (2012, June) Guidance for Industry: Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers
6. Bang, F.B. (1956) A Bacterial Disease of Limulus Polyphemus. Bulletin of the John Hopkins Hospital, 98, 325
7. Levin, J., & Bang, F. B. (1964). A description of cellular coagulation in the Limulus. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 115, 337–345.
8. Levin, J., & Bang, F. B. (1964). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 115, 265–274.
9. Levin, J., & Bang, F. B. (1968). Clottable protein in Limulus: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 19, 186–197.