

iBET™ Лизат амебоцитов Limulus (ЛАЛ-реактив) для гель-тромб теста

Флакон на несколько определений

Инструкция по использованию

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР

LAL03B, LAL06B, LAL125B, LAL25B, LAL50B
LAL03C, LAL06C, LAL125C, LAL25C, LAL50C

НАЗНАЧЕНИЕ

iBET™ Лизат амебоцитов Limulus (ЛАЛ-реактив) для гель-тромб теста предназначен для *in vitro* определения эндотоксинов (липополисахаридов) грам-отрицательных бактерий с использованием гель-тромб теста. 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.

ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Гель-тромб тест используется как качественный или полуколичественный метод определения эндотоксинов грам-отрицательных бактерий. В данном анализе определенный объем испытуемого образца смешивают с ЛАЛ-реактивом, полученным из клеток крови мечехвостов. Далее реакционную смесь инкубируют при температуре 37°C в течение 60 минут, избегая сотрясания, для того чтобы произошла реакция коагуляции, активируемая эндотоксинами. Положительный результат характеризуется формированием плотного геля, который сохраняет свою целостность при переворачивании реакционной пробирки на 180 градусов. Образование плотного геля

указывает на то, что концентрация эндотоксинов в образце как минимум равна заявленной чувствительности используемого ЛАЛ-реактива. Наоборот, отрицательный результат наблюдается, когда стабильного геля не образуется, и реакционная смесь либо остается жидкой, либо образуется слабый гель, который разрушается при переворачивании, означая, что концентрация эндотоксинов в образце ниже порога чувствительности ЛАЛ-реактива.

ПРИНЦИПЫ

В основе гель-тромб теста лежит сохранившийся биологический механизм защиты мечехвостов. 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. Данный каскад начинается с активации в лизате фактора С, сериновой протеазы, который специфически активируется молекулами эндотоксина. Затем активированный фактор С разрезает и активирует фактор В, следующий профермент в системе. В свою очередь, активированный фактор В переводит просвертывающий фермент в свертывающий фермент. Наконец, свертывающий фермент воздействует на коагулоген, растворимый белок в ЛАЛ-реактиве, разрезая его на нерастворимые мономеры фибрина. Эти мономеры связываются в стабильный гель-матрикс, который выглядит как твердый сгусток.

Образование данного геля является прямым индикатором присутствия эндотоксинов, целостность геля при переворачивании реакционной емкости отражает, соответствует ли или превышает концентрация эндотоксинов пороговую чувствительность используемого ЛАЛ-реактива.

РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

Реактив для гель-тромб теста

Лизат амебоцитов *Limulus* (ЛАЛ-реактив) для гель-тромб теста получают из американских мечехвостов *Limulus polyphemus*. В процессе производства реактива активность фактора G была остановлена. Таким образом, реактив не взаимодействует с глюканами и может использоваться для определения эндотоксинов в присутствии глюканов. Чувствительность ЛАЛ-реактива обозначается как λ . λ выражается в единицах



SHANGHAI BETMAT BIOTECHNOLOGY Ltd.

эндотоксина на миллилитр (ЕЭ/мл), это наименьшая концентрация эндотоксина, которая может достоверно вызывать образование геля в стандартных условиях проведения анализа.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

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

ТРЕБУЕМЫЕ РЕАКТИВЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. Вода для ЛАЛ-теста: в ЛАЛ-тесте используется вода, свободная от эндотоксинов. Концентрация эндотоксинов должна быть <0.005 ЕЭ/мл.

2. Стандарт эндотоксина:

Международный стандарт эндотоксина (RSE):

- Стандарт эндотоксина Фармакопеи США
- Международный стандарт эндотоксина ВОЗ
- Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ).

Стандарт эндотоксина используется для подготовки контролей и для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива. Активность КСЭ указана в сертификате анализа.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. Стекланные апирогенные реакционные пробирки 10 x 75 мм.
2. Стекланные апирогенные пробирки для подготовки разведений стандартов эндотоксина.
3. Дозаторы с апирогенными наконечниками.
4. Вортекс.
5. Термоблок или водяная баня без циркуляции воды ($37 \pm 1^\circ\text{C}$).
6. Таймер.
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 депирогенизированы 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, подавляющих 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 апиrogenные растворы 0,1 N натрия гидроксида, 0,1 N хлороводородной кислоты или апиrogenный 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.

Используя Международный стандарт эндотоксина (RSE) Фармакопеи США или Международный стандарт эндотоксина ВОЗ или Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ), подготовьте серию двукратных разведений эндотоксина. Концентрация растворов эндотоксина должна быть равна значениям 2λ, λ, 0.5λ и 0.25λ.

Сначала приготовьте исходный раствор стандарта эндотоксина. Для этого добавьте воду для ЛАЛ-теста для растворения RSE или КСЭ, перемешайте на вортексе не менее 15 минут, если используете RSE, и не менее 5 минут, если используете КСЭ. После интенсивного перемешивания исходного раствора стандарта эндотоксина подготовьте рабочие растворы эндотоксина с концентрациями 2λ, λ, 0.5λ и 0.25λ, 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.

3. Подготовка контролей.

- Положительный контроль – это раствор эндотоксина с концентрацией 2λ.
- Положительный контроль образца – это раствор испытуемого образца с добавлением стандарта эндотоксина, обычно в концентрации 2λ.
- Отрицательный контроль – это вода для ЛАЛ-теста.

4. Подготовка реактива.

Перед восстановлением ЛАЛ-реактива дайте ему прогреться до комнатной температуры. Восстановите ЛАЛ-реактив, добавив во флакон указанное на этикетке количество воды для ЛАЛ-теста. Перемешайте осторожно, но тщательно. Не перемешивайте на вортексе, так как содержимое флакона может запениться.

Внимание:

- Восстановленный лизат должен быть использован в течение 10 минут.
- Если лизат заморозить сразу же при температуре $\leq -20^{\circ}\text{C}$, он сохраняет свою стабильность до одного месяца.
- Восстановленный лизат может быть заморожен и разморожен только один раз.

5. Каждая реакционная смесь содержит 0,1 мл ЛАЛ-реактива и 0,1 мл раствора эндотоксина / контроля / образца.

Перенесите в реакционные стеклянные пробирки 10x75 мм по 0,1 мл растворов контролей, стандартов эндотоксина или испытуемого образца. Вносить растворы следует, начиная с отрицательного контроля и затем двигаясь от самой низкой концентрации эндотоксина к самой высокой. Далее внесите в каждую пробирку по

0,1 мл восстановленного ЛАЛ-реактива. Сразу же перемешайте осторожно, но тщательно. Инкубируйте реакционные смеси при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 60 минут ± 2 минуты в водяной бане без циркуляции или в термоблоке, избегая вибрации во время инкубирования.

6. После завершения инкубирования оцените результаты анализа, доставая из инкубатора каждую пробирку по одной и переворачивая ее на 180° одним плавным движением.
7. Запись результатов анализа.

Если в пробирке образовался плотный гель, который не разрушается при переворачивании пробирки, результат считается положительным. Отрицательным результатом считается отсутствие плотного геля.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- **Отрицательный контроль:** все повторности должны быть отрицательными. Если получен положительный результат, это указывает на контаминацию.
- **Положительный контроль:** все повторности должны быть положительными. Отрицательный результат может говорить о потере ферментативной активности ЛАЛ-реактивом, снижении активности эндотоксина или ошибке в разведениях эндотоксина.
- **Положительный контроль препарата:** отрицательный результат в положительном контроле препарата указывает на наличие мешающих факторов в образце.

МЕТОД АНАЛИЗА: ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЗАЯВЛЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛИЗАТА

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности лизата амебоцитов» должен быть проведен при использовании новой серии лизата или при внесении в условия проведения анализа любых изменений, которые могут повлиять на результаты теста.

Подготовьте серию двукратных разведений раствора эндотоксина до концентраций 2λ , λ , 0.5λ и 0.25λ . Каждая концентрация должна быть проверена в четырех повторностях. Отрицательный контроль должен быть проверен в двух повторностях.

Запишите результаты анализа как показано в примере ниже:

Повторности f	Концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл) и результат анализа				Отрицатель ный контроль	Конечная точка реакции (ЕЭ/мл) e	log	$\Sigma (\log)/f$	$\lambda_c =$ Antilog ($\Sigma (\log)/f$)
	2 λ	λ	0,5 λ	0,25 λ					
	0,5	0,25	0,125	0,06					
1	+	+	-	-	-	0,25	-0,602	-0,602	0,25
2	+	+	-	-	-	0,25	-0,602		
3	+	+	-	-		0,25	-0,602		
4	+	+	-	-		0,25	-0,602		

Конечная точка реакции (e) – это наименьшая концентрация в серии стандартов эндотоксина, которая вызывает гелирование лизата.

Определите среднее геометрическое значение конечной точки реакции путем расчета среднего значения логарифмов концентраций эндотоксина в конечной точке реакции для четырех повторностей и затем вычисления антилогарифма среднего значения, как показано в следующей формуле:

λ_c - это среднее геометрическое значение концентраций в конечной точке реакции
= antilog ($\Sigma (\log)/f$)

где $\Sigma (\log)$ – это сумма логарифмов концентраций в конечной точке реакции в каждой из повторностей, f – количество повторностей. Среднее геометрическое значение концентраций в конечной точке реакции λ_c – это определенное значение чувствительности лизата (в ЕЭ/мл). Если это значение составляет не менее 0,5 λ и не более 2 λ , заявленная чувствительность подтверждена и используется в дальнейших анализах с данным лизатом.

В данном примере заявленная чувствительность равна 0,25 ЕЭ/мл, количество повторностей f = 4, $\lambda_c = 0,25$, λ_c составляет не менее 0,5 λ и не более 2 λ , заявленная чувствительность подтверждена.

МЕТОД АНАЛИЗА: МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Анализ на мешающие факторы используется для оценки наличия в образце факторов, мешающих реакции. Подготовьте серию двукратных разведений эндотоксина в воде для ЛАЛ-теста и в матрице образца, проведите анализ для двух серий разведений параллельно, рассчитайте среднее геометрическое значение конечной точки реакции для каждой серии.

- **Мешающие факторы отсутствуют:** среднее геометрическое значение конечной точки реакции в матрице образца составляет не менее 0,5 λ и не более 2 λ.
- **Преодоление мешающих факторов:** влияние мешающих факторов обычно зависит от концентрации и может быть уменьшено путем разведения образца водой для ЛАЛ-теста, разведение не должно превышать МДР (Максимально допустимое разведение). Использование ЛАЛ-реактива с более высокой чувствительностью позволяет увеличить разведение образца, потенциально уменьшая влияние мешающих факторов.

МЕТОД АНАЛИЗА: ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТ

Для определения концентрации эндотоксинов с помощью полуколичественного гель-тромб теста подготовьте серию двукратных разведений испытуемого образца. Проводите испытание до определения конечной точки реакции. Рассчитайте концентрацию эндотоксинов путем умножения среднего геометрического значения фактора разведения для конечной точки на заявленную чувствительность лизата.

Ниже приведен пример результатов анализа:

Повторности	Разведения образца						Отрицательный контроль	Разведение конечной точки реакции	Log ₁₀ конечной точки реакции	Среднее значение	Log ₁₀ ⁻¹
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64					
f											
1	+	+	+	+	-	-	-	1/16	-1.204	-1.054	0.088 (1/11.4)
2	+	+	+	-	-	-	-	1/8	-0.903		

В данном примере чувствительность ЛАЛ-реактива равна 0,125 ЕЭ/мл,

Концентрация эндотоксина = чувствительность ЛАЛ-реактива x разведение конечной точки реакции = 0,125 ЕЭ/мл x 11,4 ЕЭ/мл = 1,4 ЕЭ/мл.

МЕТОД АНАЛИЗА: КАЧЕСТВЕННЫЙ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТ

Качественный гель-тромб тест используется в случае, когда необходимо проверить

образец на соответствие предельному содержанию эндотоксинов, установленному в фармакопейной статье.

Разведите образец до разведения, не превышающего МДР (Максимально допустимого разведения). Проведите анализ методом гель-тромб тест для этого разведения вместе с положительным контролем препарата, положительным контролем и отрицательным контролем.

Анализ считается достоверным, если обе повторности положительного контроля препарата и положительного контроля положительные, а обе повторности отрицательного контроля отрицательные. Если для двух повторностей испытуемого образца получены отрицательные результаты, образец считается прошедшим испытание. Если для двух повторностей испытуемого образца получены положительные результаты, образец считается не прошедшим испытание. Если для одной повторности испытуемого образца получен положительный результат, а для другой получен отрицательный результат – повторите анализ. В повторном анализе испытуемый образец прошел испытание, если для двух повторностей образца получены отрицательные результаты. Испытуемый образец не прошел испытание, если для одной или двух повторностей образца получены положительные результаты. Однако, если образец не прошел испытания в разведении меньшем чем МДР, анализ может быть повторен в большем разведении, не превышающим МДР.

ССЫЛКИ

1. United States Pharmacopeia. Chapter <85> Bacterial Endotoxins.
2. European Pharmacopoeia. Chapter 2 .6.14 Bacterial Endotoxins
3. United States Pharmacopeia. Chapter 〈1085〉 Guidelines on the Endotoxins Test
4. 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.



SHANGHAI BETMAT BIOTECHNOLOGY Ltd.

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.