

Bioendo™ EC набор для проведения хромогенного анализа по конечной точке на 64 определения

Каталожный номер
EC64405S

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для проведения хромогенного анализа по конечной точке Bioendo™ EC предназначен для количественного определения *In Vitro* бактериальных эндотоксинов грам-отрицательных бактерий (липополисахаридов).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Только для использования *In Vitro*. Не использовать для определения эндотоксемии у человека.

ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Хромогенный тест по конечной точке проводится путем добавления бесцветного раствора искусственного белкового субстрата к смеси лизата амебоцитов с испытуемым образцом после определенного периода инкубирования. Если в образце присутствует эндотоксин, развивается желтое окрашивание. Его абсорбция (при длине волны 405 нм) соотносится с концентрацией эндотоксина, таким образом, уровень эндотоксина в неизвестных образцах может быть рассчитан по стандартной кривой.

ПРИНЦИПЫ

Лиофилизированный хромогенный лизат амебоцитов (ТАЛ или ЛАЛ) - это водный экстракт циркулирующих амебоцитов китайского мечехвоста (*Tachypleus tridentatus*). Лизат содержит каскад сериновых протеаз (проферментов), которые могут быть активированы бактериальными эндотоксинами. Эндотоксины активируют проферменты, в результате чего образуются активированные ферменты (называемые коагулазами), последние катализируют расщепление бесцветного субстрата, высвобождая окрашенный в желтый цвет продукт рNA (пара-нитроанилин). Высвобожденный рNA может быть измерен фотометрически при 405 нм.

Абсорбция положительно коррелирует с концентрацией эндотоксинов. Основываясь на этом возможно количественно определить концентрацию эндотоксинов в образце.

Реактивы, входящие в поставку

1. Лиофилизированный лизат амебоцитов

Каталожный номер EC17, флакон с голубой этикеткой.

Два флакона лиофилизированного лизата амебоцитов, 1,7 мл во флаконе. Лиофилизированный лизат амебоцитов был получен из лизата амебоцитов *Tachypleus tridentatus*, лизат стабилизирован моновалентными и дивалентными катионами.

В зависимости от времени инкубирования, в хромогенном анализе по конечной точке
Xiamen Bioendo Technology Co., Ltd.

можно определить различный диапазон концентраций эндотоксина. Данный набор рассчитан на процедуру определения в одном из двух диапазонов: 0,1 – 1 ЕЭ/мл или 0,01 – 0,1 ЕЭ/мл. На лизате не указана специфическая чувствительность. Чувствительность в каждом тесте (обозначаемая λ) – это наименьшая концентрация эндотоксина, используемая для построения стандартной кривой. Наибольшая чувствительность данного набора составляет 0,01 ЕЭ/мл.

Рекомендуется хранить при температуре 2-8 °С. Избегайте воздействия температур выше 25 °С и яркого света в течение длительного времени.

Растворенный лизат должен быть использован в течение 10 минут. Если заморозить разведенный лизат при температуре ниже -20 °С сразу после разведения, реактив будет стабилен до 28 дней. Размораживайте только один раз.

2. Вода для БЭТ

Каталожный номер TRW50, флакон с серой этикеткой.

Три флакона воды для БЭТ, 50 мл во флаконе. Содержание эндотоксинов в воде для БЭТ составляет менее 0.005 ЕЭ/мл. Вода для БЭТ используется для растворения лизата, КСЭ и хромогенного субстрата, для приготовления разведений стандартов эндотоксина и испытуемых образцов и в качестве отрицательного контроля (blank). Вода для БЭТ должна храниться при температуре 2-30 °С.

3. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ)

Каталожный номер CSE10, флакон с красной этикеткой.

Два флакона контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), бактериальный штамм *E. coli* O111:B4. Каждый флакон содержит 10-60 ЕЭ лиофилизированного эндотоксина, активность КСЭ указана в Сертификате Анализа. Храните при температуре 2-8 °С.

Растворите КСЭ с помощью воды БЭТ (воды для ЛАЛ-теста). Объем для разведения указан в Сертификате Анализа. Перемешайте на вортексе в течение 5 минут. Разведенный раствор эндотоксина с активностью менее 20 ЕЭ/мл стабилен до одного дня при температуре 2-8 °С, раствор эндотоксина с активностью равной или выше 20 ЕЭ/мл стабилен не менее одной недели при температуре 2-8 °С. Не замораживайте раствор эндотоксина.

4. Хромогенный субстрат

Каталожный номер ECCS17, флакон с желтой этикеткой.

Четыре флакона лиофилизированного хромогенного субстрата, 1,7 мл во флаконе. Храните при температуре 2-8 °С. Каждый флакон субстрата растворяется с помощью объема воды БЭТ, указанного на этикетке. Растворенный хромогенный субстрат стабилен в течение недели при температуре 2-8 °С.

5. Требуемые реактивы, не входящие в поставку

25% водный раствор ледяной уксусной кислоты (стоп-реактив), хранение при температуре 2-8 °С. Способ приготовления как указан ниже:

Вода БЭТ (мл)	Ледяная уксусная кислота (мл)	Сток-реактив
15	5	20 мл/флакон

75	25	100 мл/флакон
----	----	---------------

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Апирогенные пипетки на 1 мл и 100 мкл или автоматические дозаторы с апирогенными наконечниками.
2. Апирогенные 96-луночные микропланшеты (каталожный номер MP96, MPC96 или эквивалент).
3. Апирогенные стеклянные пробирки для разведений для подготовки стандартов эндотоксина и испытуемых образцов (каталожный номер T1310030, T1310005, T1310005C или эквивалент).
4. Штатив для пробирок.
5. Таймер.
6. Вортекс.
7. Микропланшетный ридер с фильтром на 405 нм.
8. Термоблок с функцией нагрева до 37 ± 1 °C с адаптером для микропланшет (если используется ридер без функции инкубирования).
9. Апирогенные резервуары для реактивов (не обязательно).
10. Многоканальный дозатор (не обязательно).

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Вся стеклянная посуда, пластик и растворители, контактирующие с образцами или реактивами, должны быть свободными от эндотоксинов. Стеклянная посуда и другие термоустойчивые материалы могут быть депириогенизированы в сухожаровом шкафу с использованием валидированного процесса, обычно используемые минимальное время и температура составляют 60 минут при 250 °C.

Следует использовать технику асептической работы на всем протяжении анализа.

Испытуемые образцы должны храниться в условиях, при которых остановлена вся бактериологическая активность. Образцы следует хранить при температуре 2-8°C не более 24 часов или при температуре ниже -10°C в течение более длительного времени.

Оптимальный диапазон pH для реакции ТАЛ-реактива с эндотоксином составляет от 6.0 до 8.0. Кислые или щелочные образцы могут быть доведены до желаемого значения pH с помощью апирогенных 0.1N растворов натрия гидроксида или хлороводородной кислоты или апирогенного трис-буфера.

Всегда измеряйте pH аликвоты отдельного раствора образца, чтобы избежать контаминации pH-электродом.

Препарат следует проверить на возможность ингибирования, в случае необходимости ингибирование должно быть преодолено как описано в разделе **ИНГИБИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА**.

ПОДГОТОВКА РЕАКТИВОВ

Предупреждение: дайте реактивам прогреться до комнатной температуры перед использованием. Все растворы могут быть приготовлены при комнатной температуре.

Подготовка стандартов эндотоксина

Предупреждение: Растворяйте КСЭ немедленно перед использованием.

1. Растворите КСЭ с помощью воды БЭТ. Объем воды для разведения указан в сертификате анализа. Интенсивно перемешайте в течение 5 минут на вортексе для получения исходного раствора с концентрацией 10 ЕЭ/мл. Исходный раствор эндотоксина стабилен в течение одного дня при температуре 2-8 °С. Не замораживайте раствор эндотоксина.

2. Для определения эндотоксинов в диапазоне от 0,1 ЕЭ/мл до 1,0 ЕЭ/мл.

Подготовьте растворы стандартов эндотоксина с концентрациями 0,1 ЕЭ/мл, 0,25 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл и 1,0 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 0,2 мл исходного раствора эндотоксина с концентрацией 10 ЕЭ/мл и 1,8 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 1,0 мл раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл и 1,0 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 0,5 мл раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл и 1,5 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,25 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 0,2 мл раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл и 1,8 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл.

Для определения эндотоксинов в диапазоне от 0,01 ЕЭ/мл до 0,1 ЕЭ/мл.

Подготовьте растворы стандартов эндотоксина с концентрациями 0,01 ЕЭ/мл, 0,025 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл и 0,1 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 0,2 мл исходного раствора эндотоксина с концентрацией 10 ЕЭ/мл и 1,8 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 0,2 мл раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл и 1,8 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 1,0 мл раствора эндотоксина с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл и 1,0 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,05 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 0,5 мл раствора эндотоксина с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл и 1,5 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,025 ЕЭ/мл.

Смешайте в апиrogenной пробирке 0,2 мл раствора эндотоксина с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл и 1,8 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,01 ЕЭ/мл.

3. По истечении 4 часов оставшиеся разведения эндотоксина следует выбросить.

Подготовка ТАЛ-реактива и хромогенного субстрата

Предупреждение: Растворяйте немедленно перед использованием.

1. Осторожно постучите флаконом, чтобы порошок ТАЛ-реактива собрался на дне флакона, добавьте 1,7 мл воды для БЭТ к лиофилизированному лизату. Осторожно перемешайте флакон путем покачивания и покручивания, пока все содержимое не

перейдет в раствор. Небольшое количество порошка лизата на крышке не влияет на тест.

2. Растворите хромогенный субстрат с помощью 1,7 мл воды для БЭТ.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Предупреждение: следующие эксперименты должны проводиться при $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Микропланшет должен быть прогрет в течение 10 минут в микропланшетном ридере или термоблоке перед добавлением реактивов.

Для определения эндотоксинов в диапазоне от 0,01 ЕЭ/мл до 0,1 ЕЭ/мл:

1. Дайте планшету прогреться в термоблоке до температуры $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$.
2. Оставляя планшет при $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$, внесите в соответствующие лунки планшета по 50 мкл воды для БЭТ (отрицательный контроль), растворов стандартов эндотоксина с концентрациями 0,01 ЕЭ/мл, 0,025 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,1 ЕЭ/мл и испытуемых образцов. Каждый раствор анализируется в двух повторностях.
3. Внесите по 50 мкл ТАЛ-реактива в каждую лунку. (Если используется многоканальный дозатор, внесите необходимое количество ТАЛ-реактива в резервуар для реактивов, затем перенесите по 50 мкл ТАЛ-реактива в каждую лунку). Сразу же тщательно перемешайте. Важно соблюдать последовательность в порядке и скорости добавления реактива от лунки к лунке или от ряда к ряду.
4. Закройте планшет защитной пленкой, оставьте планшет в термоблоке на время, указанное в сертификате анализа.
5. Внесите необходимое количество хромогенного субстрата в резервуар для реактивов (не обязательно). Перенесите по 100 мкл хромогенного субстрата в каждую лунку. Сразу же тщательно перемешайте. Порядок внесения хромогенного субстрата должен совпадать с шагом 3.
6. Закройте планшет защитной пленкой, оставьте планшет в термоблоке на время, указанное в сертификате анализа.
7. Внесите необходимое количество стоп-реактива в резервуар для реактивов (не обязательно). После истечения времени инкубирования в шаге 6 внесите по 50 мкл стоп-реактива в каждую лунку. Сохраняйте тот же порядок внесения как в шагах 3 и 5. Сразу же тщательно перемешайте.
8. Измерьте абсорбцию в каждой лунке при длине волны 405 нм.

Таблица ниже описывает процедуру анализа.

	Лунки со стандартами эндотоксина	Лунки с образцами	Лунки Blank
Прогрейте планшет при $37^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$.			
Внесите воду для БЭТ			50 мкл
Внесите стандарты эндотоксина	50 мкл		
Внесите образцы		50 мкл	
Внесите ТАЛ-реактив	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Перемешайте растворы, инкубируйте при $37^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение времени (T1), указанного в сертификате анализа			
Прогрейте раствор хромогенного субстрата при $37^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 5 минут			

Внесите раствор хромогенного субстрата	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Перемешайте растворы, инкубируйте при 37 °С ± 1,0 °С в течение времени (Т2), указанного в сертификате анализа			
Внесите 50 мкл стоп-реактива	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Перемешайте растворы, измерьте абсорбцию при 405 нм			

Для определения эндотоксинов в диапазоне от 0,1 ЕЭ/мл до 1,0 ЕЭ/мл:

Вся процедура анализа такая же, как и для диапазона от 0,01 до 0,1 ЕЭ/мл, за исключением шага 2, где концентрации растворов стандартов эндотоксина составят 0,1 ЕЭ/мл, 0,25 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл и 1,0 ЕЭ/мл. В шагах 4 и 6 время инкубирования должно быть изменено на то, которое указано в сертификате анализа.

СБОР И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Линейная регрессия

1. Получите данные по значению абсорбции при 405 нм.
2. Постройте стандартную кривую

$$Y = b X + a, \text{ где}$$

y = абсорбция, x = концентрация эндотоксина,

b = наклон регрессионной кривой, a = точка пересечения с осью Y.

НАЧАЛЬНАЯ КВАЛИФИКАЦИЯ

По требованиям Фармакопеи валидация лизата амебоцитов должна проводиться при изменении условий, которые могут повлиять на результаты анализа.

1. Валидация стандартной кривой

Валидация стандартной кривой должна проводиться при получении новой партии ТАЛ-реактива. Подготовьте как минимум три концентрации эндотоксина для калибровочной кривой в диапазоне, указанном в сертификате анализа. Выполняйте анализ как минимум в трех повторностях для каждой концентрации эндотоксина. В отличие от **РУТИННЫХ ИСПЫТАНИЙ**, не усредняйте абсорбцию для всех повторностей. Абсолютное значение коэффициента корреляции, r, для поставленного ряда концентраций эндотоксина должно быть более или равно 0.980.

2. Анализ на мешающие факторы

Анализ на мешающие факторы должен быть повторен при изменении условий, которые могут повлиять на результаты анализа. Это включает изменение состава испытуемого образца или смену поставщика реактивов, но не ограничивается этим. Пожалуйста, обратитесь к разделу **ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА**.

ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА

Если есть подозрение, что препарат содержит вещества, мешающие реакции, должен быть проведен анализ оценки ингибирования/усиления реакции. Подготовьте положительный контроль препарата (РРС), РРС – это раствор препарата, к которому было добавлено известное количество эндотоксина. Концентрация эндотоксина в спайке (λm) должна быть близка к середине калибровочной кривой.

1. Проведите анализ образцов с добавлением спайка (PPC) вместе с образцами без добавления спайка.
2. Определите концентрацию эндотоксинов в образце с добавлением спайка (Cs) и в образце без добавления спайка (Ct).
3. Рассчитайте степень извлечения (R): $R = (Cs - Ct) / \lambda_m \times 100\%$.
4. Степень извлечения в диапазоне от 50% до 200% предполагает не значительное влияние мешающих факторов. Степень извлечения за пределами диапазона от 50% до 200% предполагает значительное влияние мешающих факторов. Для того, чтобы уменьшить влияние мешающих факторов до не значительного уровня обычно используются разведение и модификация.
5. Если значение R лежит за пределами диапазона 50% - 200%, повторите анализ на мешающие факторы в серии разведений препарата (разведения не должны превышать значения Максимально Допустимого Разведения).
6. Для проведения рутинных анализов лучше выбирать фактор того разведения, при котором значение R наиболее близко к 100%.

РУТИННЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для проведения рутинных испытаний подготовьте серию стандартов эндотоксина, проведите анализ неизвестных образцов и стандартов эндотоксина одновременно в одних и тех же условиях. Рассчитайте концентрацию эндотоксина в испытуемых образцах путем сравнения с результатами для стандартов. Каждая концентрация стандартов эндотоксина и испытуемые образцы должны быть проверены как минимум в двух повторностях. Рассчитайте среднее значение абсорбции для всех повторностей во время выполнения расчетов. Пользователь может включить положительный контроль препарата (PPC) как контроль на ингибирование или усиление реакции.

КРИТЕРИИ ДОСТОВЕРНОСТИ АНАЛИЗА

Анализ считается достоверным только при соблюдении следующих условий.

1. Для построения калибровочной кривой используются не менее трех концентраций эндотоксина и отрицательный контроль. Каждая концентрация эндотоксина испытывается не менее чем в трех повторностях.
2. Абсолютное значение коэффициента корреляции (r) для стандартной кривой должно быть ≥ 0.980 .
3. Значение абсорбции для всех повторностей с отрицательным контролем должно быть ниже, чем значение для самого низкого из стандартов.
4. Коэффициент вариации (C.V.) равен стандартному отклонению абсорбции, деленному на среднее значение и обычно выражается в процентах. Коэффициент вариации %C.V. для абсорбции для повторностей должен быть менее 10%.

ОКРАШЕННЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для окрашенных образцов и образцов, которые образуют желтое окрашивание в кислой среде, должен быть поставлен контроль образца. Единственное различие между контролем образца и испытуемым образцом состоит в том, что для контроля образца ТАЛ-реактив заменяется на равный объем воды для БЭТ. Если значение абсорбции для контроля образца составляет более, чем 0,5, образец следует развести и проверить заново.

ССЫЛКИ

- 1.Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, USP 26 NF 21. 2003.
- 3.Bang, F. B. 1956. A Bacterial Disease of Limulus Polyphemus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98:325-351.
- 4.Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
- 5.Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
- 6.Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.