

## **Bioendo™ EC набор для проведения хромогенного анализа по конечной точке с диазо-реактивом на 80 определений**

### **КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР**

EC80545

### **НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор для проведения хромогенного анализа по конечной точке с диазо-реактивом Bioendo™ EC предназначен для количественного определения *In Vitro* бактериальных эндотоксинов грам-отрицательных бактерий (липополисахаридов). Не использовать для определения эндотоксемии у человека.

### **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 (АЛ, ЛАЛ или ТАЛ) с испытуемым образцом после определенного периода инкубирования. Если в образце присутствует эндотоксин, развивается желтое окрашивание. Его поглощающая способность (при длине волны 405 нм) соотносится с концентрацией эндотоксина, таким образом, уровень эндотоксина в неизвестных образцах может быть рассчитан по стандартной кривой.

Чувствительность хромогенного анализа по конечной точке может быть улучшена путем добавления в реакционную смесь диазо-реактива после остановки реакции. В этом анализе используется длина волны 545 нм.

### **ПРИНЦИПЫ**

Лиофилизированный лизат амебоцитов - 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.

Альтернативно, описанная выше реакция может быть остановлена путем добавления диазо-реактивов. рNA реагирует с нитритом в HCl, далее полученное соединение реагирует с N-(1-Нафтил)-этилендиамином (NEDA) с образованием диазотированного производного пурпурного цвета, которое поглощает свет при 545 нм. Поглощающая

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

## **РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ**

### **1. Лиофилизированный лизат амебоцитов:**

Пять флаконов лиофилизированного лизата амебоцитов, 1,7 мл во флаконе.

Лиофилизированный лизат амебоцитов был получен из лизата амебоцитов *Tachypleus tridentatus*, лизат стабилизирован моновалентными и дивалентными катионами.

Для данного набора диапазон определения составляет 0,1-1,0 ЕЭ/мл. На лизате не указана конкретная чувствительность. Чувствительность в каждом анализе (обозначаемая  $\lambda$ ) – это наименьшая концентрация эндотоксина, используемая для построения стандартной кривой. Наибольшая чувствительность данного набора составляет 0,1 ЕЭ/мл.

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

### **2. Вода для БЭТ:**

Четыре флакона вода 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 амебоцитов, 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):**

Пять флаконов контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), каждый флакон содержит 5-20 ЕЭ лиофилизированного эндотоксина, активность КСЭ указана в Сертификате Анализа. Храните при температуре 2-8 °С. Растворите КСЭ с помощью (Р/10) мл воды БЭТ, (Р – активность КСЭ). Интенсивно перемешайте на вортексе в течение 5 минут. Полученный исходный раствор КСЭ имеет концентрацию 10 ЕЭ/мл. Разведенный раствор эндотоксина стабилен до 24 часов при температуре 2-8 °С. Не замораживайте раствор эндотоксина.

### **4. Хромогенный субстрат (Флакон с желтой крышкой)**

Пять флаконов лиофилизированного хромогенного субстрата. Храните при температуре 2-8 °С. Каждый флакон хромогенного субстрата растворяется с помощью 1,7 мл воды для БЭТ. Растворенный хромогенный субстрат стабилен в течение одной недели при температуре 2-8 °С.

### **5. Диазо-реактивы**

Диазо-реактив 1, нитрит натрия, растворите нитрит натрия с помощью 10 мл стоп-реактива 0.48N HCl; диазо-реактив 2, сульфат аммония, растворите с помощью 10 мл воды для БЭТ; диазо-реактив 3, N-(1-Нафтил)-этилендиамина дигидрохлорид (NEDA), растворите с помощью 10 мл воды для БЭТ.

### **6. ТРЕБУЕМЫЕ РЕАКТИВЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ**

50 мл 0.48N HCl (стоп-реактив), способ приготовления:

Вода для БЭТ (мл)	НСІ (мл)	Стоп-реактив
50	2	52 мл/флакон
10	0,4	10,4 мл/флакон

## ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Апирогенные пипетки объемом 0,1 мл, 1,0 мл и 5,0 мл или автоматические дозаторы с апирогенными наконечниками.
2. Стеклянные апирогенные пробирки для реакции и для разведения эндотоксина, испытуемых образцов.
3. Вортекс.
4. Водяная баня ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) или термоблок.
5. Спектрофотометр
6. Таймер.

## 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  $250^\circ\text{C}$ .

Следует использовать технику асептической работы на всем протяжении анализа.

Испытуемые образцы должны храниться в условиях, при которых остановлена вся бактериологическая активность. Образцы могут храниться непродолжительное время при температуре  $2-8^\circ\text{C}$  (не более 24 часов), в течение более длительного времени образцы должны храниться при температуре ниже  $-10^\circ\text{C}$ .

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

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

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

## ПОДГОТОВКА РЕАКТИВОВ

### Подготовка стандартов эндотоксина

**Предупреждение: Растворяйте КСЭ немедленно перед использованием.**

1. Растворите КСЭ с помощью (P/10) мл воды для БЭТ, интенсивно перемешайте на вортексе в течение 5 минут. Полученный исходный раствор КСЭ имеет концентрацию 10 ЕЭ/мл. Исходный раствор эндотоксина стабилен до 24 часов при температуре  $2-8^\circ\text{C}$ . 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 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 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 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 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.

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

### **Подготовка лиофилизированного лизата амебоцитов и других реактивов**

**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.

Растворенный лизат амебоцитов должен быть использован в течение 10 минут. Если заморозить восстановленный лизат амебоцитов при температуре ниже  $-20^{\circ}\text{C}$ , реактив будет стабилен до 21 дня. Размораживайте только один раз.

2. Растворите хромогенный субстрат с помощью 1,7 мл воды для БЭТ.
3. Растворите диазо-реактив 1 с помощью 10 мл стоп-реактива 0,48N HCl;
4. Растворите диазо-реактив 2 с помощью 10 мл воды для БЭТ,
5. Растворите диазо-реактив 3 с помощью 10 мл воды для БЭТ.

### **ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

1. Анализ проводится в двух повторностях.
2. Внесите в пробирки по 0,1 мл воды для БЭТ (в качестве отрицательного контроля), стандартов эндотоксина с концентрациями 0,1 ЕЭ/мл, 0,25 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 1 ЕЭ/мл или испытуемых образцов.
3. Добавьте в апиrogenные пробирки по 0,1 мл лиофилизированного лизата амебоцитов, хорошо перемешайте.
4. Инкубируйте реакционные смеси при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение времени, указанного в сертификате анализа.
5. После инкубирования добавьте по 0,1 мл раствора хромогенного субстрата, хорошо перемешайте.
6. Инкубируйте реакционные смеси при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение времени, указанного в сертификате анализа.
7. Добавьте по 0,5 мл раствора диазо-реактива 1, хорошо перемешайте.
8. Добавьте по 0,5 мл раствора диазо-реактива 2, хорошо перемешайте.

9. Добавьте по 0,5 мл раствора диазо-реактива 3, хорошо перемешайте.

10. Измерьте поглощение при 545 нм.

Процедура анализа приведена в таблице ниже.

	Пробирки с отрицательным контролем	Пробирки со стандартами эндотоксина	Пробирки с образцами
Внесите воду для БЭТ	0,1 мл		
Внесите стандарты эндотоксина		0,1 мл	
Внесите образцы			0,1 мл
Добавьте лиофилизированный лизат амебоцитов	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл
Хорошо перемешайте, инкубируйте при 37°C в течение времени, указанного в сертификате анализа.			
Добавьте раствор хромогенного субстрата	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл
Хорошо перемешайте, инкубируйте при 37°C в течение времени, указанного в сертификате анализа.			
Добавьте 0,5 мл диазо-реактива 1, хорошо перемешайте	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Добавьте 0,5 мл диазо-реактива 2, хорошо перемешайте	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Добавьте 0,5 мл диазо-реактива 3	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Хорошо перемешайте, измерьте поглощение при 545 нм.			

## СБОР И АНАЛИЗ ДАННЫХ

- Получите данные по значениям поглощения при 545 нм.
- Постройте стандартную кривую  

$$Y = bX + a$$
 где  
 $y$  = поглощение,  $x$  = концентрация эндотоксина,  
 $b$  = наклон регрессионной кривой,  $a$  = точка пересечения с осью  $Y$ .
- Анализ считается достоверным только при соблюдении следующих требований:
  - Для построения стандартной кривой подготовлено минимум три концентрации эндотоксина в пределах диапазона калибровочной кривой вместе с отрицательным контролем. Анализ проводится минимум в трех повторностях для каждой концентрации эндотоксина.
  - Значение коэффициента корреляции ( $r$ ) равно или более 0.980.
  - Значения поглощения для всех повторностей с отрицательным контролем ниже, чем для наименьшей концентрации эндотоксина в стандартной кривой.

## ИНГИБИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА

Если есть подозрение, что препарат содержит вещества, мешающие реакции, должен быть проведен анализ оценки ингибирования/усиления реакции. Добавьте к образцу известное количество эндотоксина, концентрация эндотоксина в спайке ( $\lambda m$ ) должна быть в середине диапазона калибровочной кривой.

- Проведите анализ образцов с добавлением спайка (положительный контроль препарата)

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 ингибирование 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%.

## ОКРАШЕННЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для окрашенных образцов должен быть поставлен контроль образца. Единственное различие между контролем образца и испытуемым образцом состоит в том, что для контроля образца лиофилизированный лизат амебоцитов заменяется на равный объем воды для БЭТ. Если значение поглощения для контроля образца составляет более, чем 0,5, образец следует развести и проверить заново.

## ССЫЛКИ

- 1.Руководство по валидации ЛАЛ-теста в качестве испытания на содержание эндотоксинов в готовых парентеральных лекарственных формах для медицинского и ветеринарного применения, биологических продуктах и изделиях медицинского назначения. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
- 2.Глава <85> Бактериальные эндотоксины. Rockville, MD: Фармакопея США.
- 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.