

## **Bioendo™ КС набор для проведения кинетического хромогенного анализа**

### **Каталожный номер**

КС5028, КС0828, КС0517, КС64Т

### **НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор для проведения кинетического хромогенного анализа Bioendo™ КС предназначен для количественного определения *In Vitro* бактериальных эндотоксинов грам-отрицательных бактерий (липополисахаридов) с помощью кинетического хромогенного метода.

Описанная здесь процедура анализа соответствует требованиям статьи <85> Бактериальные эндотоксины Фармакопеи США.

### **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**

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

### **ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА**

Кинетический хромогенный тест – это количественный анализ для определения содержания эндотоксинов грам-отрицательных бактерий. Анализ проводится путем смешивания хромогенного лизата амебоцитов с испытуемым образцом и последующего измерения абсорбции при 405 нм в течение 120 минут при температуре 37 °С. Скорость увеличения абсорбции пропорциональна концентрации эндотоксинов в образце. Быстрое увеличение абсорбции указывает на высокое содержание эндотоксинов, в то время как медленное увеличение указывает на низкую концентрацию.

Концентрация эндотоксинов определяется на основании увеличения скорости изменения абсорбции.

### **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 рНА (пара-нитроанилин). Высвобожденный рНА может быть измерен фотометрически при 405 нм. С образованием рНА абсорбция при 405 нм увеличивается. Скорость увеличения абсорбции положительно коррелирует с концентрацией эндотоксинов. Таким образом, время, необходимое для достижения определенного увеличения абсорбции (onset OD), называемое начальным временем, отрицательно коррелирует с концентрацией эндотоксинов. Основываясь на этом возможно количественно определить концентрацию эндотоксинов в образце.

## **Реактивы, входящие в поставку**

### **1. Хромогенный лизат амебоцитов**

Каталожный номер КС28, флакон с синей этикеткой.

Лиофилизированный хромогенный реактив представляет собой смесь лизата амебоцитов и хромогенного субстрата. Хромогенный реактив был получен из лизата амебоцитов *Tachypleus tridentatus*, лизат был стабилизирован моновалентными и дивалентными катионами. Предел определения данного набора составляет 0.005 ЕЭ/мл. Растворяйте реактив буфером для разведения, объем для разведения реактива указан на этикетке.

Храните при температуре 2-8 °С. Избегайте воздействия яркого света. Растворенный хромогенный лизат должен быть использован в течение 10 минут. Если заморозить разведенный хромогенный лизат при температуре ниже -20 °С сразу после разведения, реактив будет стабилен до 14 дней. Размораживайте только один раз.

### **2. Буфер для разведения**

Каталожный номер КСРВ35, КСРВ60 или КСРВ30, флакон с зеленой этикеткой. Буфер для разведения используется для растворения хромогенного реактива. Перед использованием дайте буферу прогреться до комнатной температуры.

Храните буфер при температуре 2-8 °С.

### **3. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ)**

Каталожный номер ССЕ10, флакон с красной этикеткой.

Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ), каждый флакон содержит 20-199 ЕЭ лиофилизированного эндотоксина, активность КСЭ указана в Сертификате Анализа. Храните при температуре 2-8 °С.

Растворяйте с помощью воды БЭТ (воды для ЛАЛ-теста). Объем для разведения указан в Сертификате Анализа. Перемешайте на вортексе в течение 5 минут. Разведенный эндотоксин стабилен в течение 7 дней при температуре 2-8 °С. Не замораживайте раствор эндотоксина.

### **4. Вода для БЭТ**

Каталожный номер TRW50, флакон с серой этикеткой.

Вода для БЭТ, 50 мл во флаконе. Содержание эндотоксинов в воде для БЭТ менее 0.005 ЕЭ/мл. Вода для БЭТ используется для разведения КСЭ, стандартов эндотоксина и испытуемых образцов и в качестве отрицательного контроля (blank). Вода для БЭТ должна храниться при температуре 2-30 °С.

**Внимание: Вода для БЭТ включена в наборы КС0828 и КС64Т, не включена в наборы КС5028 и КС0517.**

## **ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ**

1. Одноканальные дозаторы с апирогенными наконечниками.

Многоканальные дозаторы с апирогенными резервуарами для реактивов или репетир с апирогенным шприцем-резервуаром.

2. Апирогенные стеклянные пробирки для разведений для подготовки стандартов эндотоксина и испытуемых образцов (каталожный номер Т1310030, Т1310005, Т1310005С или эквивалент).

3. Вортекс.
4. Апирогенные 96-луночные микропланшеты (каталожный номер MP96, MPC96 или эквивалент).
5. Инкубационный микропланшетный ридер (BioTek™ ELx808IULALXH, BioTek™ ELx808IU) с ПО для кинетических анализов.

## ХРАНЕНИЕ 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 депирогенизированы в сухожаровом шкафу с использованием валидированного процесса, обычно используемые минимальное время и температура составляют 60 минут при 250 °С.

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 рН для реакционной смеси 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.

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

## ПОДГОТОВКА СТАНДАРТОВ ЭНДОТОКСИНА

Растворите контрольный стандарт эндотоксина с помощью воды БЭТ, интенсивно перемешайте не менее 5 минут на вортексе для получения исходного раствора с концентрацией 50 ЕЭ/мл. Исходный раствор стабилен после разведения в течение 7 дней при температуре 2-8 °С. Не замораживайте раствор эндотоксина. Перед использованием раствор эндотоксина должен быть интенсивно перемешан на вортексе не менее 5 минут.

Подготовьте растворы стандартов эндотоксина с концентрациями 0.005 ЕЭ/мл, 0.05 ЕЭ/мл, 0.5 ЕЭ/мл и 5 ЕЭ/мл. **Если необходимо, стандартная кривая может достигать концентрации 50 ЕЭ/мл.**

1. Смешайте в апирогенной пробирке 0.1 мл исходного раствора эндотоксина с концентрацией 50 ЕЭ/мл и 0.9 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 5 ЕЭ/мл.
2. Смешайте в апирогенной пробирке 0.1 мл раствора эндотоксина с концентрацией 5 ЕЭ/мл и 0.9 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл.
3. Смешайте в апирогенной пробирке 0.1 мл раствора эндотоксина с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл и 0.9 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,05 ЕЭ/мл.
4. Смешайте в апирогенной пробирке 0.1 мл раствора эндотоксина с концентрацией 0,05 ЕЭ/мл и 0.9 мл воды для БЭТ, перемешайте 1 минуту для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,005 ЕЭ/мл.
5. По истечении 4 часов оставшиеся разведения эндотоксина следует выбросить.

## УСТАНОВКИ ПАРАМЕТРОВ РИДЕРА

Установите температуру инкубатора на 37 °С. Установите шаблон и процедуру анализа.

Установите длину волны 405 нм и значение onset OD от 0.02 до 0.5 в соответствии с сертификатом анализа.

Установите параметры считывания как кинетический анализ в течение 120 минут с интервалами считывания 60 секунд.

Установите скорость перемешивания планшета как среднюю в течение 5 секунд перед началом измерения.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Начинайте анализ после того, как температура инкубатора достигнет 37 °С.
2. Анализ проводится в двух повторностях.
3. Перемешивайте стандарты эндотоксина и образцы перед внесением в лунки планшета.
4. Внесите по 100 мкл воды для БЭТ (отрицательный контроль), растворов стандартов эндотоксина и испытуемых образцов в лунки планшета. Избегайте образования пузырей.
5. После выполнения пункта 4 следует преинкубировать планшет в течение 10 минут в инкубаторе ридера.
6. После начала преинкубирования растворите каждый флакон хромогенного ТАЛ-реактива с помощью указанного на этикетке объема **буфера для разведения**. Осторожно перемешайте флакон, наклоняя и покачивая, до полного растворения содержимого. Не используйте вортекс. Растворенный хромогенный ТАЛ-реактив должен быть использован в течение 10 минут при комнатной температуре. Если требуется больше одного флакона, объедините перед использованием два или более флаконов.
7. Внесите хромогенный ТАЛ-реактив в резервуар для реактивов, перемешайте покачиванием резервуара из стороны в сторону. Быстро добавьте по 100 мкл хромогенного реактива в каждую лунку планшета. Рекомендуется использовать многоканальный дозатор или репетир. Избегайте образования пузырей. Оставьте планшет без крышки.
8. Поместите планшет в кинетический инкубационный ридер.
9. Запустите ПО для кинетического анализа. Процедура анализа должна включать этап встряхивания планшета в течение 5 секунд перед началом измерения для того, чтобы достаточно перемешать хромогенный ТАЛ-реактив и испытуемый образец. Считывание следует проводить каждые 60 секунд в течение 120 минут при длине волны 405 нм.

## СБОР И АНАЛИЗ ДАННЫХ

### Линейная регрессия

1. Получите данные по начальному времени для значения onset OD от 0.02 до 0.5 при 405 нм в соответствии с сертификатом анализа.
2. Постройте стандартную кривую  $\log_{10} y = b (\log_{10} x) + a$ ,

где

$y$  = реакционное время (начальное время),  $x$  = концентрация эндотоксина  $b$  = наклон регрессионной кривой,  $a$  = точка

пересечения с осью Y.

## Полиномиальная регрессия

Если абсолютное значение коэффициента корреляции ( $r$ )  $\geq 0.980$ , для построения стандартной кривой может быть использована полиномиальная регрессия. Полиномиальная регрессия повышает точность вычисления концентрации эндотоксинов на всем диапазоне калибровочной кривой. При использовании полиномиальной регрессии стандартная кривая генерируется, используя десятичные логарифмы значений реакционного времени и десятичные логарифмы соответствующих им концентраций эндотоксина для составления полиномиального уравнения. Степень полиномиального уравнения, используемого для построения регрессионной кривой, определяется количеством стандартов эндотоксина в анализе. Степень полинома всегда будет на единицу меньше, чем количество стандартов эндотоксина, при этом максимальной степенью будет четвертая степень полинома для анализов с пятью и более стандартами эндотоксина, а минимальной будет вторая степень для анализов с тремя стандартами. Полиномиальное уравнение четвертой степени приведено в следующем примере:

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

Важно отметить, что полиномиальная регрессия **НЕ МОЖЕТ** быть использована для анализов **НАЧАЛЬНОЙ КВАЛИФИКАЦИИ**.

## НАЧАЛЬНАЯ КВАЛИФИКАЦИЯ

По требованиям Фармакопеи валидация хромогенного 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 хромогенного ТАЛ-реактива. Подготовьте как минимум три концентрации эндотоксина для калибровочной кривой в диапазоне, указанном в сертификате анализа. В анализ должны быть включены стандарты эндотоксина с шагом увеличения концентрации в 10 раз (log). Например, если стандартный диапазон составляет 0,005-5 ЕЭ/мл, стандарты эндотоксина могут быть 0,005, 0,05, 0,5, 5 ЕЭ/мл. Выполняйте анализ как минимум в трех повторностях для каждой концентрации эндотоксина. В отличие от **РУТИННЫХ ИСПЫТАНИЙ**, не усредняйте пороговое время 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 (PPC), PPC – это раствор препарата, к которому было добавлено

известное количество эндотоксина. Концентрация эндотоксина в спайке ( $\lambda_m$ ) 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 ( $C_s$ ) и в образце без добавления спайка ( $C_t$ ).
3. Рассчитайте степень извлечения (R):  $R = (C_s - C_t) / \lambda_m \times 100\%$ .
4. Степень извлечения в диапазоне от 50% до 200% предполагает незначительное 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 незначительного 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 порогового времени для всех повторностей во время выполнения расчетов.

Пользователь может включить положительный контроль препарата (PPC) как контроль на ингибирование или усиление реакции. Например, если используется диапазон калибровочной кривой 0,005-5 ЕЭ/мл, PPC может быть приготовлен путем внесения 10 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 5,0 ЕЭ/мл к 100 мкл испытуемого образца (или его разведения). Концентрация эндотоксина в лунке составит 0,5 ЕЭ/мл. Осторожно перемешайте, постукивая по краям планшета.

## 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  $\geq 0.980$ .
3. Начальное время для всех повторностей с отрицательным контролем должно быть больше, чем начальное время 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

Если значение абсорбции при проверке окрашенных образцов превышает 1,5 единицы поглощения, образцы следует развести до значения абсорбции менее 1,5 единиц поглощения.

## 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.