

**ALGIMED**  
**TECHNO**



## **НАБОР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МАТ**

**РУКОВОДСТВО ПО ПРОВЕДЕНИЮ ТЕСТА НА  
АКТИВАЦИЮ МОНОЦИТОВ (МЕТОДЫ А, В И С)**

# ВВЕДЕНИЕ

Тест активации моноцитов (МАТ) – это новый метод определения полного спектра пирогенных веществ. Метод позволяет определять как бактериальные эндотоксины, так и пирогены неэндотоксиновой природы (пептидогликаны, дрожжи, грибы, вирусы). Тест является полной заменой анализа на пирогенность, проводимого на кроликах, и позволяет отказаться от использования животных.

В основе метода лежит способность клеток крови моноцитов образовывать в присутствии пирогенных веществ природный медиатор воспаления – интерлейкин-6. Эта же реакция происходит и в нашем организме *in-vivo* при попадании пирогенных веществ в кровяное русло. Анализ проводится в два этапа: в первый день анализа готовят разведения испытуемых препаратов, стандартов эндотоксина и неэндотоксиновых контролей. Калибровочную кривую строят с помощью растворов международного стандарта эндотоксина. Далее все разведения в четырех повторностях помещают в стерильный 96-ти луночный планшет, во все лунки вносят суспензию моноцитов и инкубируют планшет в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 18-22 часов. Подготовку растворов испытуемых препаратов и контролей проводят в ламинаре, соблюдая все правила работы с клетками.

Во второй день анализа супернатант из планшета с моноцитами переносят на планшет для ИФА с иммобилизованными антителами к интерлейкину-6 и определяют содержание выделившегося интерлейкина-6 с помощью метода ИФА. Далее измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 450 нм на стандартном спектрофотометре. С помощью специального программного обеспечения или программы Excel определяют концентрацию пирогенных веществ в растворах. Чем выше значение оптической плотности раствора, тем больше в нем концентрация интерлейкина-6, и, соответственно, пирогенных веществ.

В состав набора «ALPYR MAT» производства ООО «Альгимед Техно» входят все необходимые компоненты для проведения анализа, включая международный стандарт эндотоксина (RSE) и контроли неэндотоксиновой природы, в качестве которых в набор включены липотейхоевая кислота, являющаяся фрагментом клеточной стенки Грам-положительных бактерий, и термоинактивированный золотистый стафилококк, также относящийся к Грам-положительным бактериям. Также в набор включен полностью готовый набор реактивов ИФА для определения содержания интерлейкина-6.

## СОСТАВ НАБОРА И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

№	Наименование компонента	Количество в наборе	Условия хранения
1	<b>Клетки МАТ</b> - криоконсервированные моноциты периферической крови, 10 млн. клеток/мл	1x1 мл	- 80 °С и ниже
2	<b>Добавка к культуральной среде FBS</b> - фетальная бычья сыворотка с ультранизким содержанием эндотоксина	1x5 мл	- 20 °С
3	<b>Среда RPMI</b> - содержит L-глутамин, стерильная	1x50 мл	2 - 8°С
4	<b>Стандарт эндотоксина</b> - липополисахарид E.Coli, 2000 МЕ/мл	1x50 мкл	- 20°С
5	<b>Неэндотоксиновый контроль LTA</b> - липотейхоевая кислота, 2 мг/мл	1x50 мкл	- 20°С
6	<b>Неэндотоксиновый контроль НКSA</b> -термоинактивированный золотистый стафилококк, 10 <sup>10</sup> НКSA/мл	1x20 мкл	- 20°С
7	<b>ИФА-набор для определения интерлейкина-6</b> - набор реагентов для определения интерлейкина-6 методом ИФА, диапазон определения 10-3160 пг/мл	1 шт	2 - 8°С
8	<b>Планшет стерильный плоскодонный 96-ти луночный</b>	1 шт	2 - 30°С

ИФА-набор для определения интерлейкина-6 включает в себя следующие компоненты:

1. Иммуносорбент - 1 шт.
2. Концентрат антител к интрелейкину-6 (10x) - 1x0,6 мл
3. Конъюгат - 1x12 мл
4. Буфер для разведения - 1x30 мл
5. ТМБ-субстрат - 1x12 мл
6. Концентрат промывочного раствора (20x) - 1x30 мл
7. Стоп-реагент - 1x12 мл

Набор «ALPYR МАТ» рассчитан на проведение анализа одного 96-ти луночного планшета.

# ОБОРУДОВАНИЕ И РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

## Оборудование:

- Микропланшетный фотометр со светофильтром 450 нм и 570-650 нм ;
- CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37 °С и влажность более 80%);
- Ламинарный бокс;
- Вортекс;
- Водяная баня на 37 °С;
- Морозильник на -80 °С;
- Шейкер или инкубатор для микропланшетов;
- Дозаторы на 5, 10-100, 100-1000 и 5000 мкл;
- 8-ми канальный дозатор на 50-350 мкл;
- Промыватель для микропланшетов (вошер) – желательно.

## Расходные материалы:

- Стеклянные апиrogenные пробирки для разведений, размер 12×75 мм;
- Вода для ЛАЛ-теста (ВЕТ) – вода, не содержащая эндотоксинов;
- Стерильные пластиковые пробирки объемом 15 мл;
- Стерильные наконечники для дозаторов;
- Нестерильные наконечники для дозаторов;
- 70% этанол или 70% изопропанол;
- Стерильные резервуары для многоканальных дозаторов;
- Нестерильные резервуары для многоканальных дозаторов;
- Вата, пинцет, ножницы.

## Важные замечания

Первый этап анализа необходимо выполнять в ламинаре, используя защитный халат и перчатки. Все расходные материалы и реактивы должны быть апиrogenными. Все поверхности в ламинаре необходимо регулярно обрабатывать 70% этанолом или 70% изопропанолом.

# ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Анализ должен проводиться в условиях, исключающих контаминацию растворов. Все реактивы и материалы должны быть стерильными и апиrogenными.

## Подготовка разведений стандарта эндотоксина

Стандарт эндотоксина представляет собой липополисахарид E.Coli (EDQM, Франция), откалиброванный в международных единицах эндотоксина (МЕ). Для построения калибровочной кривой (метод А и В) используется серия двукратных разведений стандарта эндотоксина. Для этого готовят не менее 4-х концентраций растворов стандарта эндотоксина. Проводят испытание, используя не менее 4-х повторностей для каждой концентрации раствора. Однако для получения более сигмоидной калибровочной кривой и для достижения более высокой чувствительности метода рекомендуется ставить от пяти до семи точек калибровочной кривой. Максимальная чувствительность набора составляет 0,015 МЕ/мл. В данном руководстве рассматривается пример постановки калибровочной кривой до концентрации 0,015 МЕ/мл.

### 1. Приготовление исходного раствора стандарта эндотоксина 100 МЕ/мл.

Размораживают флакон со стандартом эндотоксина и добавляют к нему 950 мкл среды RPMI. Тщательно перемешивают раствор на вортексе не менее 60 секунд. Полученный раствор имеет концентрацию 100 МЕ/мл.

### 2. Приготовление калибровочных растворов эндотоксина для метода А (R1-R7).

Для приготовления калибровочного раствора R1 в апиrogenную пробирку вносят 5940 мкл среды RPMI и 60 мкл стандарта эндотоксина с концентрацией 100 МЕ/мл. Тщательно перемешивают на вортексе не менее 60 секунд. Концентрация эндотоксина в полученном растворе составляет 1 МЕ/мл.

Приготовление калибровочных растворов R2-R7 можно проводить в стеклянных апиrogenных пробирках или в планшете для проведения анализа.

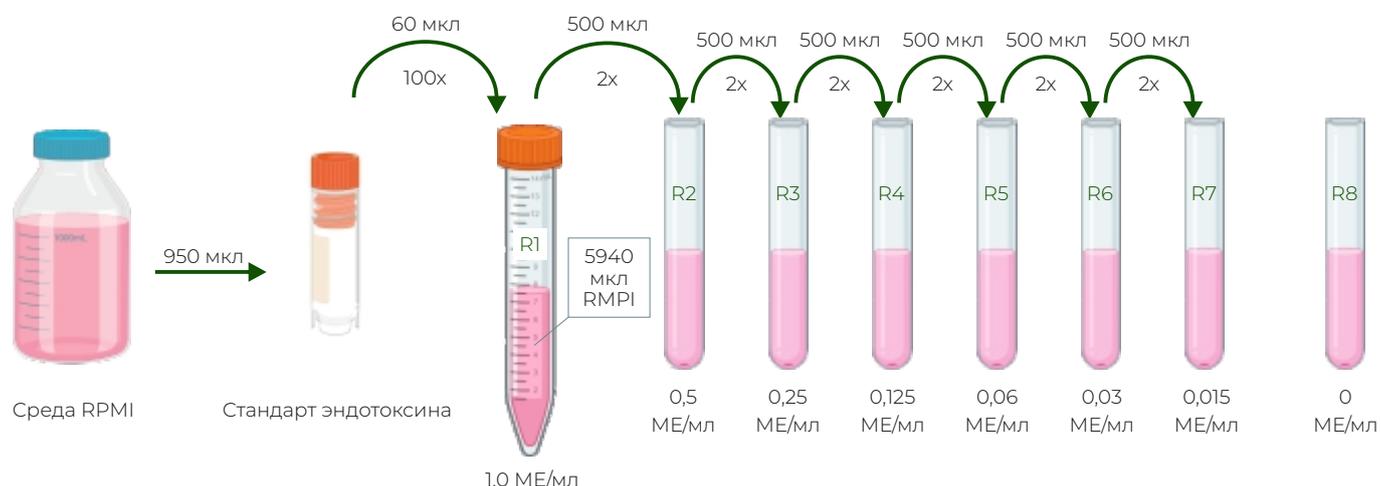
**Приготовление разведений эндотоксина в пробирках.** Вносят по 500 мкл среды RPMI в 7 пробирок, маркированных R2-R8 (R8 – отрицательный контроль – среда RPMI, не содержащая эндотоксина). В пробирку R2 переносят 500 мкл раствора из пробирки R1. Тщательно перемешивают на вортексе не менее 60 секунд. Таким же образом выполняют последовательное разведение для калибровочных растворов R3-R7 (Рис. 1).

**Приготовление разведений эндотоксина в планшете.** В лунки В1-В4 – Н1-Н4 стерильного 96-ти луночного планшета вносят по 200 мкл среды RPMI. В лунки А1-А4 вносят по 200 мкл раствора с концентрацией 1 МЕ/мл из пробирки R1. С помощью многоканального дозатора выполняют перенос 100 мкл раствора из лунок А1-А4 в лунки В1-В4, тщательно перемешивают пипетированием, избегая образования пены. В лунках В1-В4 концентрация эндотоксина составляет 0,5 МЕ/мл. Аналогичным образом выполняют последовательный перенос раствора для лунок С1-С4 – G1-G4. Из лунок G1-G4 удаляют по 100 мкл раствора. В лунки Н1-Н4 раствор эндотоксина не вносится – это отрицательный контроль опыта.

### 3. Приготовление растворов эндотоксина для метода В

При проведении испытания методом В готовят разведения стандарта эндотоксина до концентраций, соответствующих 0,5хПО, 1хПО, 2хПО, 4хПО, 8хПО, где ПО – предел определения метода, то есть наименьшая концентрация эндотоксина в калибровочной кривой. Все разведения стандарта эндотоксина проводятся таким же образом, как и для метода А.

Рис. 1 - Подготовка стандартов эндотоксина в пробирках



## Подготовка неэндотоксиновых контролей

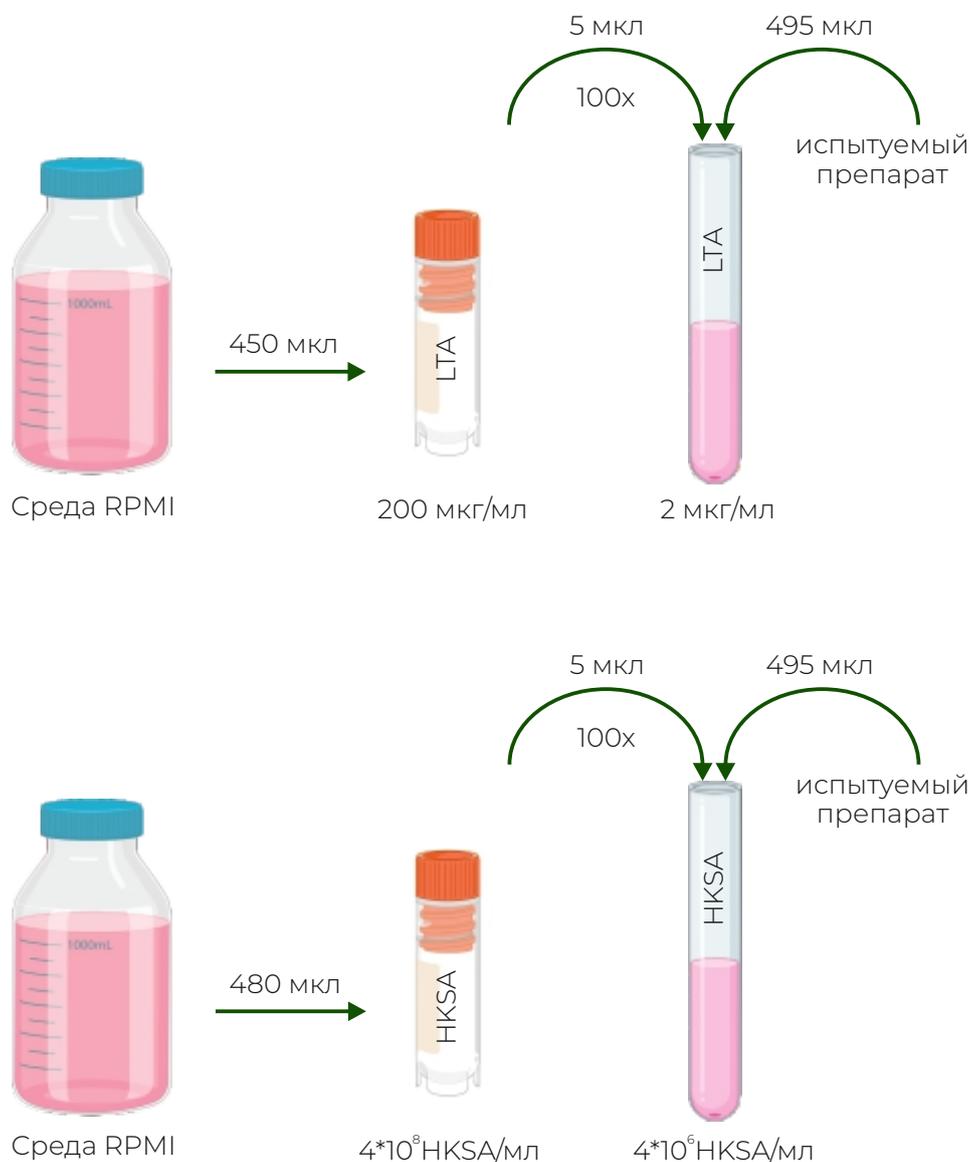
### 1. Приготовление неэндотоксинового контроля LTA.

Размораживают флакон с LTA и добавляют к нему 450 мкл среды RPMI для получения исходного раствора с концентрацией 200 мкг/мл. Тщательно перемешивают на вортексе не менее 60 секунд. Для приготовления неэндотоксинового контроля препарата добавляют 5 мкл исходного раствора LTA к 495 мкл соответствующего разведения испытуемого препарата.

### 2. Приготовление неэндотоксинового контроля HKSA.

Размораживают флакон с HKSA и добавляют к нему 480 мкл среды RPMI для получения исходного раствора с концентрацией  $4 \cdot 10^8$  HKSA/мл. Тщательно перемешивают на вортексе не менее 60 секунд. Для приготовления неэндотоксинового контроля препарата добавляют 5 мкл исходного раствора HKSA к 495 мкл соответствующего разведения испытуемого препарата.

Рис. 2 - Подготовка неэндотоксиновых контролей



## Подготовка испытуемого образца

В зависимости от выбранного метода анализа (А, В или С) готовят соответствующие разведения испытуемого образца. В качестве растворителя используется среда RPMI. Если испытуемый препарат представляет собой порошок или субстанцию, исходный раствор препарата готовят на воде для ЛАЛ-теста (воде ВЕТ). Для метода А готовят три двукратных последовательных разведения препарата, не превышающих МДР. Самое меньшее разведение должно быть предварительно проверено на отсутствие мешающих факторов. Для методов В и С готовят три разведения, не превышающих МДР, которые были предварительно проверены на отсутствие мешающих факторов. Все разведения испытывают в четырех повторностях.

## Подготовка положительного контроля испытуемого образца

При проверке испытуемых образцов методами А и В готовят положительный контроль испытуемого образца. Для метода А к наименьшему разведению препарата добавляют стандарт эндотоксина в концентрации, равной или близкой середине калибровочной кривой. Для метода В к каждому разведению препарата добавляют эндотоксин в концентрации, равной 2хПО используемой системы. Каждый раствор испытывают в четырех повторностях.

## Подготовка планшета для анализа

В лунки стерильного 96-ти луночного планшета (входит в состав набора) вносят растворы стандарта эндотоксина, разведения испытуемых препаратов и контролей. В качестве отрицательного контроля вносят среду RPMI. Каждый раствор вносят по 100 мкл в лунку в четырех повторностях.

## Подготовка суспензии моноцитов

### 1. Приготовление культуральной среды

Культуральная среда состоит из среды RPMI, обогащенной фетальной бычьей сывороткой (ФБС). Содержание ФБС в культуральной среде составляет 20%.

Размораживают флакон с добавкой к культуральной среде (ФБС). В стерильную пробирку объемом не менее 15 мл вносят 12 мл среды RPMI. Добавляют 3 мл ФБС и осторожно перемешивают плавным покачиванием пробирки, избегая сильного пенообразования.

**✓ Перед добавлением к моноцитам культуральную среду прогревают на водяной бане до 37 °С.**

### 2. Подготовка суспензии моноцитов

Флакон с моноцитами извлекают из морозильника на -80 °С (при необходимости транспортировки используют резервуар с жидким азотом или контейнер с сухим льдом) и сразу же размораживают на водяной бане при 37 °С до тех пор, пока не исчезнут последние видимые кристаллы льда. Сразу же переносят все содержимое флакона (1 мл) в стерильную апиrogenную пробирку объемом 15 мл. Медленно (1 мл в течение 5 секунд) в пробирку вносят 5 мл культуральной среды, предварительно прогретой до 37 °С. Перемешивают плавным покачиванием пробирки во время добавления культуральной среды, чтобы получить гомогенную клеточную суспензию.

**✓ Подготовка суспензии моноцитов производится непосредственно перед внесением на планшет!**

## Внесение суспензии моноцитов на планшет

Суспензию моноцитов помещают в стерильный резервуар для многоканальных дозаторов. С помощью многоканального дозатора вносят по 50 мкл суспензии моноцитов во все лунки планшета, содержащие исследуемые образцы (испытуемые растворы, контроли, стандарты эндотоксина, неэндотоксиновые контроли и др.). Планшет закрывают крышкой и помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор при температуре 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и влажности более 80%. Инкубируют в течение 18-22 часов.

## Определение интерлейкина-6 в клеточном супернатанте

### 1. Подготовка реагентов для ИФА-анализа

Перед началом анализа все компоненты ИФА-набора необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут.

#### 1.1 Приготовление промывочного раствора

30 мл концентрата промывочного раствора переносят в стеклянную или пластиковую емкость, добавляют 570 мл дистиллированной воды и перемешивают. Полученный раствор может храниться при температуре от +2 °С до +8 °С не более 1 месяца.

#### 1.2 Приготовление раствора антител к интерлейкину-6

В резервуар для многоканальных дозаторов вносят 5,4 мл буфера для разведения и добавляют 0,6 мл концентрата антител к интерлейкину-6. Тщательно перемешивают пипетированием, избегая образования пены.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

### 2. Процедура анализа

Перед началом анализа все компоненты ИФА-набора необходимо выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут.

**2.1** Во все лунки иммуносорбента вносят по 50 мкл буфера для разведения.

**2.2** Во все лунки иммуносорбента вносят по 50 мкл раствора антител к интерлейкину, приготовленного по п.1.2.

**2.3** Осторожно, не задевая осадок клеток, из планшета с моноцитами переносят по 50 мкл супернатанта в соответствующие лунки иммуносорбента. Используют многоканальный дозатор.

**2.4** Закрывают планшет крышкой и инкубируют в течение 1,5 часов при температуре 25°С и встряхивании 700 об./мин.

**2.5** Промывают лунки планшета 5 раз по 350 мкл промывочным раствором. Рекомендуется использовать автоматический промыватель (вошер) для микропланшетов.

**✓ Выполнить следующий этап сразу после промывания планшета. Не допускать высыхания планшета на воздухе в перерывах между этапами работы.**

**2.6** Во все лунки вносят по 100 мкл конъюгата. Используют многоканальный дозатор.

**2.7** Закрывают планшет крышкой и инкубируют в течение 30 минут при температуре 25°С и встряхивании 700 об./мин.

**2.8** Промывают лунки планшета 5 раз по 350 мкл промывочным раствором. Рекомендуется использовать автоматический промыватель (вошер) для микропланшетов.

**✓ Выполнить следующий этап сразу после промывания планшета. Не допускать высыхания планшета на воздухе в перерывах между этапами работы.**

**2.9** Во все лунки планшета вносят по 100 мкл ТМБ-субстрата. Используют многоканальный дозатор. Закрывают планшет крышкой и инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.

**2.10** Во все лунки планшета вносят по 100 мкл стоп-реактанта. Используют многоканальный дозатор.

**2.11** Измеряют оптическую плотность раствора в лунках с помощью автоматического фотометра в одноволновом (при длине волны 450 нм) или двухволновом (при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 570-650 нм).

### Критерии достоверности результатов измерений

- Регрессионная зависимость ответов (соответственно преобразованных при необходимости) должна быть статистически значима ( $p < 0,01$ ).
- Регрессионная зависимость ответов от логарифма концентрации БЭ должна быть линейна ( $p > 0,05$ ).
- Для положительного контроля препарата определенное в опыте значение содержания эндотоксинов должно составлять 50-200% от известной концентрации добавленного эндотоксина.

## МЕТОДЫ АНАЛИЗА

### Предварительные испытания

#### Испытания на мешающие факторы

Для того, чтобы убедиться в достоверности результатов анализа, для каждого нового препарата необходимо провести предварительную валидацию методики. Данная валидация показывает, что испытуемый раствор не оказывает влияния на измерительную систему, и в анализе будут определяться возможные эндотоксины и пирогенные вещества, отличные от эндотоксинов.

Используя соответствующий растворитель, в геометрической прогрессии делают ряд разведений испытуемого препарата таким образом, чтобы они не превышали МДР. Для Метода А готовят такие же разведения испытуемого препарата, к которым прибавляют стандарт эндотоксина в концентрации, равной или близкой к середине калибровочной кривой), а для Метода В – равные удвоенному значению ПО (предел определения метода). Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания измеренная концентрация добавленного стандарта эндотоксина в испытуемом растворе составляет 50-200% от известной концентрации добавленного эндотоксина. Если испытание не отвечает этому критерию, испытание следует провести Методом С.

В зависимости от проводимого метода, определяются разные значения фактора разведения препарата.

Фактор разведения  $f$  для методов А и В – это наибольшая концентрация препарата (наименьшее разведение препарата), для которой определенная концентрация эндотоксина находится в пределах 50-200% от добавленной концентрации эндотоксина. Данное разведение определяется при валидации препарата.

### Для метода А:

$2xf$  – двукратное разведение препарата в разведении  $f$ , не превышающее значения МДР.  
 $4xf$  – двукратное разведение препарата в разведении  $2xf$ , не превышающее значения МДР.

### Для метода В:

$f_1$  – раствор препарата в выбранном разведении, не превышающем значения МДР. Кратность раствора конкретного испытуемого препарата выбирается в результате анализа данных валидации, например,  $\frac{1}{2}$  МДР.

$f_2$  – раствор препарата в выбранном разведении, не превышающем значения МДР. Кратность раствора конкретного испытуемого препарата выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР.

### Для метода С:

$f_1$ ,  $f_2$  и  $f_3$  - разведения испытуемого препарата, определенные для контрольной серии в испытании на мешающие факторы.

Максимально допустимое разведение (МДР) рассчитывается по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПКПВ} \times \text{КИР}}{\text{ПО}}$$

**ПКПВ** – предельная концентрация ПВ, которая выражается в эквиваленте единиц эндотоксина (ЭЕЭ) на миллиграмм или миллилитр или в единицах биологической активности лекарственного препарата (ЛП) и является критерием приемлемости для принятия положительного или отрицательного решения;

**КИР** – концентрация испытуемого раствора, т.е. концентрация испытуемого препарата или действующего вещества, для которого указано ПКПВ.

**ПО** - предел обнаружения, это концентрация бактериальных эндотоксинов, соответствующая пороговому значению, которая определяется с использованием калибровочной кривой стандарта эндотоксина или с серией лекарственного средства, утвержденной в качестве контрольной, и выражается в ЭЕЭ/мл. Один ЭЕЭ стимулирует выделение такого же количества IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , что и одна единица эндотоксина (ЕЭ).

Для расчета предельного содержания ПВ используют формулу (ОФС «Бактериальные эндотоксины»):

$$\text{ПКПВ} = \frac{\text{К}}{\text{М}}$$

**К** - пороговая пирогенная доза БЭ, выраженная на кг массы тела человека.

**М** - максимальная терапевтическая доза испытуемого ЛП, вводимая в течение одного часа на 1 кг массы тела.

## Испытание на Мешающие факторы в системе определения интерлейкина-6

После подбора оптимального разведения раствора испытуемого препарата для дальнейшего исследования проводят проверку его отрицательного влияния на результаты методики измерения маркера (интерлейкина-6.) Для этого готовят серию разведений стандарта интерлейкина-6 в присутствии и отсутствии испытуемого препарата в разведении, для которого проводилось испытание на мешающие факторы. Различие в определяемых концентрациях серий разведений стандарта интерлейкина-6 в присутствии и отсутствии испытуемого ЛС должно находиться в диапазоне  $\pm 20\%$ .

## МЕТОДА: КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

В методе А проводится сравнение полученных результатов испытуемого препарата с данными калибровочной кривой разведений стандарта эндотоксина. Концентрация ПВ в испытуемом препарате не должна превышать величину предельного содержания ПВ. Готовят три разведения испытуемого препарата – А, В и С.

- Раствор А – раствор испытуемого препарата в наименьшем разведении, для которого концентрация эндотоксина находится в пределах от 50 до 200 %. Фактор разведения –  $f$ .
- Раствор В – двукратный раствор раствора А, не превышающий значение МДР. Фактор разведения -  $2xf$ .
- Раствор С – двукратный раствор раствора В, не превышающий значение МДР. Фактор разведения -  $4xf$ .

Для каждого разведения готовят положительный контроль препарата, содержащий эндотоксин в концентрации R4.

Максимальное количество испытуемых препаратов на планшете: 2.

Диапазон концентраций эндотоксина: 0.0 - 2.0 ЕЭ/мл.

Неэндотоксиновые контроли: HKSA и LTA.

### Рекомендованное расположение растворов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R1	R1	R1	R1	A1	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A2
B	R2	R2	R2	R2	B1	B1	B1	B1	B2	B2	B2	B2
C	R3	R3	R3	R3	C1	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C2
D	R4	R4	R4	R4	AS1	AS1	AS1	AS1	AS2	AS2	AS2	AS2
E	R5	R5	R5	R5	BS1	BS1	BS1	BS1	BS2	BS2	BS2	BS2
F	R6	R6	R6	R6	CS1	CS1	CS1	CS1	CS2	CS2	CS2	CS2
G	R7	R7	R7	R7	AS1 LTA	AS1 LTA	AS1 LTA	AS1 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA
H	blank	blank	blank	blank	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA

- R1-7: Серия разведений стандарта эндотоксина Blank: Отрицательный контроль;
- A1-2: Разведения препаратов с фактором разведения  $f$ ;
- AS1-2: Разведения препаратов с фактором разведения  $f$  с добавлением эндотоксина в концентрации, равной R4;
- B1-2: Разведения препаратов с фактором разведения  $2xf$ ;
- BS1-2: Разведения препаратов с фактором разведения  $2xf$  с добавлением эндотоксина в концентрации, равной R4;
- C1-2: Разведения препаратов с фактором разведения  $4xf$ ;
- CS1-2: Разведения препаратов с фактором разведения  $4xf$  с добавлением эндотоксина в концентрации, равной R4;
- AS1-2 LTA: Разведения препаратов с фактором разведения  $f$  с добавлением LTA;
- AS1-2 HKSA: Разведения препаратов с фактором разведения  $f$  с добавлением HKSA.

## МЕТОД В: ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

При испытании методом В проводится сравнение испытуемого препарата со стандартом эндотоксина. Концентрация ПВ в испытуемом ЛС должна быть меньше предельного содержания пирогенов. Готовят три разведения испытуемого препарата – А, В и С. Для принятия решения используют раствор А, если не предусмотрено иное.

- Раствор А – раствор испытуемого препарата в разведении, при котором было проведено испытание на мешающие факторы. Фактор разведения –  $f$ .
- Раствор В – раствор испытуемого препарата в разведении, не превышающем МДР. Кратность раствора конкретного испытуемого препарата выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР/2. Фактор разведения –  $f_1$ .
- Раствор С – раствор испытуемого препарата в разведении, не превышающем МДР. Кратность раствора конкретного испытуемого препарата выбирается в результате анализа данных валидации, например, МДР. Фактор разведения –  $f_2$ .

Максимальное количество испытуемых препаратов на планшете: 3.

Диапазон концентраций эндотоксина: 0.0 - 2.0 ЕЭ/мл.

Неэндотоксиновые контроли: не требуются.

### Рекомендованное расположение растворов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R1	R1	R1	R1	A1	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A2
B	R2	R2	R2	R2	B1	B1	B1	B1	B2	B2	B2	B2
C	R3	R3	R3	R3	C1	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C2
D	R4	R4	R4	R4	AS1	AS1	AS1	AS1	AS2	AS2	AS2	AS2
E	R5	R5	R5	R5	BS1	BS1	BS1	BS1	BS2	BS2	BS2	BS2
F	R6	R6	R6	R6	CS1	CS1	CS1	CS1	CS2	CS2	CS2	CS2
G	R7	R7	R7	R7	AS1 LTA	AS1 LTA	AS1 LTA	AS1 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA	AS2 LTA
H	blank	blank	blank	blank	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS1 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA	AS2 HKSA

- R1: Стандарт эндотоксина в концентрации 0.5 x ПО используемой системы;
- R2: Стандарт эндотоксина в концентрации 1 x ПО используемой системы;
- R3: Стандарт эндотоксина в концентрации 2 x ПО используемой системы;
- R4: Стандарт эндотоксина в концентрации 4 x ПО используемой системы;
- R5: Стандарт эндотоксина в концентрации 8 x ПО используемой системы Blank: Отрицательный контроль;
- A1-3: Разведения препаратов с фактором разведения  $f_1$ ;
- AS1-3: Разведения препаратов с фактором разведения  $f_1$  с добавлением стандарта эндотоксина в концентрации 2x ПО используемой системы;
- B1-3: Разведения препаратов с фактором разведения  $f_1$ ;
- BS1-3: Разведения препаратов с фактором разведения  $f_1$  с добавлением стандарта эндотоксина в концентрации 2x ПО используемой системы;
- C1-3: Разведения препаратов с фактором разведения  $f_2$ ;
- CS1-3: Разведения препаратов с фактором разведения  $f_2$  с добавлением стандарта эндотоксина в концентрации 2x ПО используемой системы.

## МЕТОД С: СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ С СЕРИЕЙ ЛС, УТВЕРЖДЕННОЙ В КАЧЕСТВЕ СТАНДАРТНОЙ

При использовании метода С проводится сравнение испытуемого препарата (L) с серией ЛС, утвержденной в качестве контрольной (R). Контрольная серия выбирается в соответствии с обоснованными и утвержденными критериями. Готовят три разведения  $f_1$   $f_2$   $f_3$  испытуемого препарата и три разведения  $f_1$   $f_2$   $f_3$  серии препарата, утвержденной в качестве контрольной – А, В и С. Кратность разведений  $f_1$   $f_2$   $f_3$  определяют в испытании контрольной серии на мешающие факторы.

Максимальное количество испытуемых препаратов на планшете: 3.

Ряд разведений стандартов эндотоксина – не требуется.

Неэндотоксиновые контроли: не требуются.

### Рекомендованное расположение растворов:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	blank	blank								
B	LPS control	LPS control	LPS control	LPS control								
C	AR1	AR1	AR1	AR1	AR2	AR2	AR2	AR2	AR3	AR3	AR3	AR3
D	BR1	BR1	BR1	BR1	BR2	BR2	BR2	BR2	BR3	BR3	BR3	BR3
E	CR1	CR1	CR1	CR1	CR2	CR2	CR2	CR2	CR3	CR3	CR3	CR3
F	AL1	AL1	AL1	AL1	AL2	AL2	AL2	AL2	AL3	AL3	AL3	AL3
G	BL1	BL1	BL1	BL1	BL2	BL2	BL2	BL2	BL3	BL3	BL3	BL3
H	CL1	CL1	CL1	CL1	CL2	CL2	CL2	CL2	CL3	CL3	CL3	CL3

- Blank: отрицательный контроль LPS control: положительный контроль;
- AR1-3: Раствор контрольной серии в разведении  $f_1$ ;
- BR1-3: Раствор контрольной серии в разведении  $f_2$ ;
- CR1-3: Раствор контрольной серии в разведении  $f_3$ ;
- AL1-3: Раствор испытуемой серии в разведении  $f_1$ ;
- BL-3: Раствор испытуемой серии в разведении  $f_2$ ;
- CL1-3: Раствор испытуемой серии в разведении  $f_3$ .

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. ОФС 1.2.4.0016.18 «Тест активации моноцитов» ГФ XIV РФ.
2. Общая статья европейской фармакопеи 2.6.30 «Тест активации моноцитов».
3. Руководство по проведению теста на активацию моноцитов «MAT Research».
4. Инструкция на набор «ALPYR MAT» производства ООО «Альгимед Техно», РФ.

**Производитель:**

**ООО «Альгимед Техно»**

123007, Российская Федерация,  
г. Москва, ул 1-я Магистральная ,  
д . 18 стр. 1, этаж 2, ком. 25

+7 499 391 16 10, +7 925 428 95 12 📞

[techno@algimed.com](mailto:techno@algimed.com)

[www.algimed-techno.com](http://www.algimed-techno.com)

**Дистрибьютор:**

**ООО «Альгимед»**

121096, Российская Федерация,  
г. Москва, ул. Василисы Кожиной, д. 1,  
ДЦ «Парк Победы», секция 2, этаж 10, пом. 1.

+7 499 682 61 09

[mail@algimed.ru](mailto:mail@algimed.ru)

[www.algimed.ru](http://www.algimed.ru)