

Набор Bioendo™ КС для определения содержания эндотоксинов (методом кинетического хромогенного анализа)

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР

KC5028S, KC5028, KC0828S, KC0828, KC5017S, KC5017, KC0817S, KC0817.

ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Набор Bioendo™ КС для определения содержания эндотоксинов (методом кинетического хромогенного анализа) предназначен для количественного определения бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий (липополисахаридов) в условиях *in vitro* с помощью кинетического хромогенного метода.

Описанные в документе процедуры испытания соответствуют главе 85 «Испытания на бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США.

ВНИМАНИЕ!

Продукт предназначен для использования только в условиях *in vitro*. Не допускается использование для выявления эндотоксемии у людей.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА

Определение содержания эндотоксинов с помощью кинетического хромогенного анализа лизата амебоцитов представляет собой количественный анализ для обнаружения бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Анализ проводят путем смешивания лизата хромогенных амебоцитов с испытуемым образцом с последующей регистрацией оптической плотности смеси при определенной длине волны при 405 нм в течение 120 минут при температуре 37 °С. Скорость увеличения оптической плотности зависит от концентрации эндотоксина в испытуемом образце. Быстрое увеличение оптической плотности свидетельствует о высокой концентрации эндотоксина, а медленное — о низкой концентрации эндотоксина. Концентрацию эндотоксина определяют на основании скорости увеличения оптической плотности.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Лиофилизированный хромогенный лизат амебоцитов (АЛ, ТАЛ или ЛАЛ) представляет собой водный экстракт циркулирующих амебоцитов китайского мечехвоста (*Tachypleus tridentatus*). Лизат содержит группу ферментов сериновых протеаз (проферментов), активация которых может происходить под действием бактериальных эндотоксинов. Эндотоксины активируют проферменты с образованием активированных ферментов (называемых коагулазой), последняя катализирует расщепление бесцветного субстрата, высвобождая продукт рНА желтого цвета.

Концентрация высвобожденного рНА может

быть измерена фотометрически при длине волны 405 нм. При образовании рНА оптическая плотность при 405 нм увеличивается. Скорость увеличения оптической плотности положительно коррелирует с концентрацией эндотоксина. То есть время, необходимое для достижения определенного увеличения оптической плотности (начальная ОП), отрицательно коррелирует с концентрацией эндотоксина. На основании чего может быть определена концентрация эндотоксина в испытуемом образце.

РЕАКТИВЫ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКТА

1. Хромогенный лизат амебоцитов

Каталожный № KC28, флакон с маркировкой синего цвета

Лиюфилизованный хромогенный ТАЛ-

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 обнаружения предоставленного набора для анализа на эндотоксины составляет 0,005 ЕЭ / мл. Восстановить с помощью буфера для разведения, объем разведения указан на этикетке.

Хранить при температуре 2–8 °С. Не допускать воздействия солнечных лучей. Восстановленный хромогенный ТАЛ-реактив необходимо использовать в течение 10 минут. При замораживании разведенного хромогенного ТАЛ-реактива при температуре ниже -20 °С сразу после разведения реактив будет стабилен в течение 14 дней. Растворять необходимо только один раз.

2. Буфер для разведения

Каталожный № KCRB35, KCRB60 или KCRB 30, флакон с зеленой маркировкой.

Буфер для разведения используется для регидратации хромогенного ТАЛ-реактива.

Перед использованием буферному раствору дают нагреться до комнатной температуры.

Буферный раствор для восстановления следует хранить при температуре 2–8 °С.

3. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ)

Каталожный № CSE10, флакон с маркировкой красного цвета

(Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ), каждый флакон содержит **20–199 единиц**

лиофилизированного эндотоксина, активность КСЭ указана в сертификате анализа. Хранить при температуре 2–8 °С.

Восстановить КСО водой для БЭТ. Объем восстановления указан в сертификате анализа. Тщательно перемешать в течение 5 минут на вихревой мешалке. Восстановленный эндотоксин стабилен в течение до 7 дней при температуре 2–8 °С. Не замораживать раствор эндотоксина.

4. Вода для БЭТ

Каталожный № TRW50, флакон с маркировкой серого цвета

Вода для БЭТ, по 50 мл в каждом флаконе. Концентрация эндотоксина в воде для БЭТ составляет менее 0,005 ЕЭ/мл. Вода для БЭТ используется для регидратации КСЭ, для разведения стандартов эндотоксина и испытуемых образцов, а также в качестве отрицательного контроля (холостой пробы). Воду для БЭТ следует хранить при температуре 2–30 °С.

Примечание: вода для БЭТ включена в KC0828, KC0817, не включена в KC5028 и KC5017.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Одноканальные пипетки с апирогенными наконечниками.
Многоканальная пипетка с апирогенными резервуарами для реактивов или пипетка для многократного дозирования с апирогенными шприцами.
2. Стекланные пробирки для разведения, не содержащие эндотоксинов, для приготовления стандарта эндотоксина и испытуемого образца (кат. № T1310030 , T1310005 , T1310005C или аналогичные).
3. Вихревая мешалка.
4. Непиригенные 96-луночные микропланшеты (каталожные № MP96, MPC96 или аналогичные).
5. Инкубационный микропланшетный ридер (BioTek™ ELx808IULALXH или BioTek™ ELx808IU) с программным обеспечением для кинетического анализа.

ХРАНЕНИЕ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Вся стеклянная и пластиковая посуда и растворители, контактирующие с образцом или испытуемыми реактивами, не должны содержать эндотоксинов. Стеклянная посуда и другие термостойкие инструменты подлежат депирогенизации в сухожаровом шкафу согласно валидированной процедуре, в течение общепринятого минимального времени 60 минут при температуре 250 °С.

Всегда используйте асептические методы.

Испытуемые образцы должны храниться в условиях прекращения бактериологической активности. Временное хранение образцов (в течение менее 24 часов) возможно при температуре 2–8 °С, более длительное хранение — при температуре ниже –10 °С.

Оптимальный диапазон pH для реакции AL-эндотоксина составляет 6,0–8,0. Значение pH кислотного и щелочного образца можно довести до необходимого диапазона с помощью 0,1 н. раствора натрия гидроксида, 0,1 н. раствора хлористоводородной кислоты или трис-буфера, не содержащего эндотоксинов.

Потенциальные интерференции должны быть определены и устранены в соответствии с описанием в разделе «ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОДУКТА».

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА ЭНДОТОКСИНА

Контрольный стандарт эндотоксина восстанавливают с помощью воды для БЭТ, тщательно перемешивают в течение не менее 5 минут на вихревой мешалке для получения стандартного исходного раствора с концентрацией 50 ЕЭ/мл. Восстановленный исходный раствор эндотоксина стабилен в течение до 7 дней при температуре 2–8 °С. Не замораживать раствор эндотоксина. Перед использованием охлажденный раствор эндотоксина тщательно перемешивают в течение 5 минут на вихревой мешалке.

Для приготовления стандартов эндотоксина в концентрациях 0,005 ЕЭ / мл, 0,05 ЕЭ / мл, 0,5 ЕЭ / мл и 5 ЕЭ/мл, **стандартная кривая может достигать 50 ЕЭ / мл при необходимости.**

1. Смешивают 0,1 мл раствора эндотоксина с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл с 0,9 мл воды для БЭТ в пробирке, не содержащей эндотоксинов, перемешивают на вихревой мешалке в течение 1 минуты для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,01 ЕЭ/мл.
2. Смешивают 0,1 мл раствора эндотоксина с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл с 0,9 мл воды для БЭТ в пробирке, не содержащей эндотоксинов, перемешивают на вихревой мешалке в течение 1 минуты для получения раствора эндотоксина с концентрацией 0,01 ЕЭ/мл.
3. Смешайте в апиrogenной 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 апиrogenной 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. Оставшиеся разведенные растворы эндотоксина утилизируют через 4 часа.

НАСТРОЙКА МИКРОПЛАНШЕТНОГО РИДЕРА

Установите температуру инкубатора на 37 °С.

Установите шаблон и процедуру анализа.

Установите длину волны на уровне 405 нм, начальную ОП — 0,2.

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 °C.
2. Анализ проводится в двух повторностях.
3. Перемешивайте стандарты эндотоксина и образцы перед внесением в лунки планшета.
4. Переносят по 100 мкл воды для БЭТ (в качестве отрицательного контроля), стандартные растворы эндотоксинов и испытуемый образец в каждую лунку микропланшета. 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**.
7. Осторожно перемешайте флакон, наклоняя и покачивая, до полного растворения содержимого. Вихревую мешалку не используют. 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.
8. 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.
9. Поместите планшет в кинетический инкубационный ридер.
10. 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 времени достижения порогового значения оптической плотности onset OD 0.2 при 405 нм.

Строят калибровочную кривую $\log_{10} y = b (\log_{10} x) + a$, где: y — это время реакции (время начала реакции), x — концентрация эндотоксина, b — угловой коэффициент кривой регрессии, a — сдвиг по оси y .

Полиномиальная регрессия

Если абсолютное значение коэффициента корреляции (r) составляет $\geq 0,980$, для построения калибровочной кривой можно использовать полиномиальную регрессию. Полиномиальная регрессия повышает точность прогнозирования концентрации эндотоксинов во всем диапазоне содержания эндотоксинов.

При использовании полиномиальной регрессии для определения полиномиального уравнения строят калибровочную кривую с использованием логарифмических значений времени реакции и соответствующих им логарифмических концентраций эндотоксинов. Порядок полиномиального уравнения, используемого для построения кривой регрессии, определяется количеством стандартных растворов эндотоксина в анализе. Порядок полинома всегда будет на единицу меньше количества стандартных растворов эндотоксина, при этом возможен полином максимум четвертого порядка для анализа с пятью или более стандартными растворами эндотоксина и минимум второго порядка для

анализа с тремя стандартами. Полиномиальное уравнение четвертого порядка в виде следующего примера:

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

Важно отметить, что полиномиальная регрессия **НЕ СЛЕДУЕТ** использовать для анализа **НАЧАЛЬНОЙ КВАЛИФИКАЦИИ**.

НАЧАЛЬНАЯ КВАЛИФИКАЦИЯ

В соответствии с требованиями Фармакопеи валидация анализа на содержание эндотоксинов с использованием хромогенного лизата амебоцитов должна проводиться при изменении условий, которые могут повлиять на результат испытания.

Валидация калибровочной кривой

После получения новой партии реактива хромогенного лизата амебоцитов необходимо выполнить валидационное испытание калибровочной кривой. Готовят не менее трех концентраций эндотоксина в пределах диапазона калибровочной кривой, указанного в сертификате анализа.

Стандарты эндотоксина должны быть включены в выбор крайних вариантов каждого логарифмического увеличения в анализе. Например, если стандартный диапазон составляет 0,005–5 ЕЭ/мл, концентрация эндотоксина в стандарте может составлять 0,05, 0,5, 5 ЕЭ/мл. Выполняют анализ с использованием не менее трех повторностей каждой концентрации стандартного раствора эндотоксина. В отличие от **РУТИННЫХ ИСПЫТАНИЙ**, не усредняйте пороговое время для всех повторностей. Абсолютное значение коэффициента конелляции r должно быть больше или равно 0,980 для заданного диапазона концентраций эндотоксина.

2. Испытание на интерферирующие факторы

Испытание на наличие интерферирующих факторов необходимо повторить при внесении изменений в любые условия, которые могут повлиять на результат испытания. Они включают, помимо прочего, изменение состава испытуемых образцов или замену поставщика реактива хромогенного лизата амебоцитов. Пожалуйста, обратитесь к разделу **ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА**.

ИНГИБИРОВАНИЕ / УЛУЧШЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА

Если существует вероятность того, что образец содержит интерферирующие вещества, следует провести испытание на степень извлечения. Готовят положительный контроль продукта (ПКП), ПКП - это образец продукта, в который было добавлено определенное количество эндотоксина.

Концентрация эндотоксина в спайке (λ_m) должна быть близка к середине калибровочной кривой.

1. Образец с добавкой анализируют (положительный контроль) вместе с образцом без добавки.
2. Определяют концентрацию эндотоксина в испытуемом образце с добавкой (C_s) и испытуемом образце без добавки (C_t).
3. Рассчитывают степень извлечения (R): $R = (C_s - C_t) / \lambda_m / 100 \%$.
4. Степень извлечения в диапазоне 50–200 % указывает на незначительную интерференцию. Степень извлечения, выходящая за пределы диапазона 50–200 %, указывает на значительную интерференцию. Для снижения интерференции до незначительного уровня обычно используют разбавление и модификацию.
5. Если R находится за пределами диапазона 50–200 %, повторяют испытание на ингибирование с использованием серии разведений (разведение не должно превышать максимально допустимое разведение) испытуемого образца.
6. Для проведения рутинных анализов лучше выбирать фактор того разведения, при котором значение R наиболее близко к 100%.

РУТИННЫЕ ИСПЫТАНИЯ

При проведении рутинных испытаний готовят серию стандартов эндотоксина, анализируют стандарты эндотоксина и неизвестные образцы одновременно в одних и тех же условиях. Рассчитывают концентрацию эндотоксина в неизвестных образцах путем сравнения с характеристиками стандартов. Каждый стандарт и неизвестный образец следует анализировать как минимум в двух повторностях. В ходе расчётов усредняют время начала реакции всех растворов. Пользователь может включить положительный контроль продукта (РРС) в качестве монитора для ингибирования или усиления продукта. Например, если используется диапазон калибровочной кривой 0.005-5 ЕЭ/мл, ПКП 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 составляет 0,5 ЕЭ / мл. Осторожно перемешайте, постукивая по краям планшета.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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. Выполняют анализ с использованием не менее трех повторностей каждой концентрации стандартного раствора эндотоксина.
2. Абсолютное значение коэффициента корреляции (r) для стандартной кривой должно быть ≥ 0.980 .
3. Время начала реакции у обоих негативных контролей больше, чем у стандартного раствора с наименьшей концентрацией.
4. Коэффициент вариации (C.V.) равен стандартному отклонению абсорбции, деленному на среднее значение и обычно выражается в процентах. % C.V. для абсорбции для повторностей должен быть менее 10%.

ЦВЕТНЫЕ 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 как испытания на определение бактериальных эндотоксинов в готовом продукте для анализа лекарственных препаратов для парентерального введения, биологических лекарственных препаратов и медицинских изделий для медицинского и ветеринарного применения. Департамент здравоохранения и социального обеспечения США, Служба общественного здравоохранения, Управление контроля качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, декабрь 1987 г.
2. Глава 85. Бактериальные эндотоксины. Роквилл, штат Мэриленд: Фармакопея США.
3. Бэнг, Ф. Б. 1956 г. Бактериальное заболевание у мечехвостов. Информационный бюллетень госпиталя Джонса Хопкинса 98: 325–351.
4. Левин, Дж. и Ф. Б. Бэнг. 1964 г. Описание клеточной коагуляции у мечехвостов. Информационный бюллетень госпиталя Джонса Хопкинса 115: 337–345.
5. Левин, Дж. и Ф. Б. Бэнг. 1964 г. Роль эндотоксина во внеклеточной коагуляции крови мечехвостов. Информационный бюллетень госпиталя Джонса Хопкинса 115: 265–274.
6. Левин, Дж. и Ф. Б. Бэнг. 1968 г. Свертывающий белок у мечехвостов: его локализация и кинетика коагуляции эндотоксином. Тромб. Диат. Геммораг. 19: 186–197.