

Набор для испытания на эндотоксины Bioendo™ EC (хромогенный анализ по конечной точке), 64 теста/набор

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ

EC64405S

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор для испытания на эндотоксины Bioendo™ EC (хромогенный анализ по конечной точке) предназначен для количественного определения *in vitro* грамотрицательных бактериальных эндотоксинов (липополисахаридов).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

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

ВЫПОЛНЕНИЕ АНАЛИЗА

Количественное определение хромогенного эндотоксина по конечной точке проводят путем добавления бесцветного раствора искусственного пептидного субстрата в смесь лизата амебоцитов и испытуемого образца после определенного периода инкубации. Если эндотоксин присутствует в образце, появляется желтый цвет. Его оптическая плотность ($\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$) связана с концентрацией эндотоксина, поэтому уровни эндотоксина в неизвестных образцах могут быть рассчитаны по стандартной кривой.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Лиофилизированный 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.

Оптическая плотность положительно коррелирует с концентрацией эндотоксина, на основании чего количественно определяют концентрацию эндотоксина.

РЕАКТИВЫ В СОСТАВЕ НАБОРА

1. Лиофилизированный лизат амебоцитов

Номер по каталогу EC17, флаконы с синей маркировкой

Два флакона лиофилизированного АЛ, по 1,7 мл каждый. Лиофилизированный АЛ был получен из лизата амебоцитов *Tachypleus tridentatus*. Лизат стабилизирован одновалентными и двухвалентными катионами.

При различном времени инкубации хромогенный анализ в конечной точке может обнаружить различные диапазоны концентрации эндотоксина. Методика для двух диапазонов представлена в этом наборе для анализа: один диапазон 0,1-1,0 ЕЭ/мл, а другой – 0,01-0,1 ЕЭ/мл. На лизат не наносят маркировку определенной чувствительности. Чувствительность в данном испытании

(обозначенная как λ) – это самая низкая концентрация эндотоксина, используемая для построения стандартной кривой. Наибольшая чувствительность λ данного набора составляет 0,01 ЕЭ/мл. Рекомендуется хранить при температуре 2-8 °С. Избегать воздействия температуры выше 25 °С или яркого света в течение продолжительного времени.

Восстановленный АЛ-реактив необходимо использовать в течение 10 минут. Если восстановленный АЛ-реактив замораживается при температуре ниже -20 °С сразу после восстановления, он остается стабильным до 28 дней. Растворение допускается только один раз.

2. Вода для БЭТ

Номер по каталогу TRW50, флакон с серой маркировкой

Три флакона с водой для БЭТ, по 50 мл каждый. Концентрация эндотоксина в воде для БЭТ составляет менее 0,005 ЕЭ/мл. Вода для БЭТ используется для регидратации реактива АЛ, КСЭ и хромогенного субстрата, для разведения стандартов эндотоксина и испытуемых образцов, а также в качестве отрицательного контроля (холостого раствора). Воду для БЭТ следует хранить при температуре 2-30 °С.

3. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ)

Номер по каталогу CSE10, флакон с красной маркировкой

Два флакона с контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ), бактериальный штамм *E. coli* O111:B4. Каждый флакон содержит 10-60 ЕЭ лиофилизированного эндотоксина, содержание действующего вещества КСЭ указано в сертификате анализа. Хранят при температуре 2-8 °С. Контрольный стандарт эндотоксина разводят водой для БЭТ. Объем восстановления указан в сертификате анализа. Тщательно перемешивают в течение 5 минут на вихревой мешалке. Восстановленный раствор эндотоксина с активностью менее 20 ЕЭ/мл стабилен в течение одного дня при температуре 2-8 °С, раствор эндотоксина с активностью 20 ЕЭ/мл и выше стабилен в течение минимум одной недели при температуре 2-8 °С. Не замораживать раствор эндотоксина.

4. Хромогенный субстрат

Номер по каталогу ECCS17, флаконы с желтой маркировкой

Четыре флакона лиофилизированного хромогенного субстрата, по 1,7 мл каждый. Хранить при температуре 2-8 °С. Каждый флакон субстрата регидратируют с помощью указанного в маркировке количества воды для БЭТ. Восстановленный хромогенный субстрат стабилен в течение одной недели при температуре 2-8 °С.

5. НЕОБХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В КОМПЛЕКТ:

25 % об/об ледяной уксусной кислоты в воде (стоп-реагент), хранить при температуре 2-8 °С.

Методика приготовления заключается в следующем:

Вода для БЭТ (мл)	Уксусная кислота ледяная (мл)	Стоп-реагент
15	5	20 мл/флакон
75	25	100 мл/флакон

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Апирогенные пипетки, 1,0 мл, 100 микролитров. Или автоматические пипетки с апирогенными наконечниками.
2. Апирогенный микропланшет (номер по каталогу: MP96, MPC96 или аналогичные).

3. Стекланные пробирки для разведения эндотоксинов и разведения образцов, не содержащие эндотоксинов (номер по каталогу: T1310030, T1310005, T1310005C или аналогичные).
4. Штатив для пробирок.
5. Таймер.
6. Вихревая мешалка.
7. Считывающее устройство для микропланшета с фильтром 405 нм.
8. Термостат сухого нагрева при температуре 37 ± 1 °C с адаптером для микропланшетов (при использовании неинкубируемого считывателя микропланшетов).
9. Резервуары для апиrogenных реактивов (дополнительно).
10. Многоканальный пипеточный дозатор (дополнительно).

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ

Вся стеклянная и пластиковая посуда, а также растворители, которые будут контактировать с испытуемым образцом или испытуемыми реактивами, не должны содержать эндотоксины. Стеклянная посуда и другие термостойкие инструменты подлежат депирогенизации в сухожаровом шкафу согласно валидированной процедуре, в течение общепринятого минимального времени 60 минут при температуре 250 °C.

Необходимо всегда соблюдать принципы асептики.

Испытуемые образцы следует хранить в условиях, при которых прекращается бактериальная активность. Временное хранение образцов (в течение менее 24 часов) возможно при температуре 2-8 °C, более длительное хранение – при температуре ниже -10 °C.

Оптимальный диапазон pH для АЛ-теста определения эндотоксинов составляет от 6,0 до 8,0.

Кислотность и щелочность образца можно скорректировать до желаемого диапазона pH путем добавления не содержащего эндотоксин 0,1 н. натрия гидроксида, 0,1 н. хлористоводородной кислоты или не содержащего эндотоксин Трис-буфера.

Всегда измеряйте значение pH аликвоты нерасфасованного образца, чтобы исключить загрязнение pH-электродом.

Следует выполнить проверку наличия возможных мешающих факторов и устранить их согласно описанию, представленному в разделе «ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ РЕАКЦИИ».

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВА

Внимание! Дайте реактивам нагреться до комнатной температуры перед использованием.

Все растворы могут быть приготовлены при комнатной температуре.

Приготовление стандартов эндотоксина

Внимание! Разведение КСЭ выполняют непосредственно перед использованием.

1. Контрольный стандарт эндотоксина разводят водой для БЭТ. Объем восстановления указан в сертификате анализа. Энергично перемешивают в течение 5 минут на вихревой мешалке; полученный раствор – 10 ЕЭ/мл исходный раствор эндотоксина. После восстановления исходный раствор эндотоксина стабилен в течение одного дня при температуре 2-8 °C, раствор эндотоксина не замораживают.
2. **Для обнаружения эндотоксина в диапазоне от 0,1 до 1,0 ЕЭ/мл:**
Готовят стандартные растворы эндотоксинов в концентрациях 0,1 ЕЭ/мл, 0,25 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл и 1,0 ЕЭ/мл.
Эндотоксин с концентрацией 10 ЕЭ/мл в объеме 0,2 мл смешивают с 1,8 мл воды для БЭТ, перемешивают с помощью вихревой мешалки в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл.

Смешивают 1,0 мл эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл с 1,0 мл воды для БЭТ, перемешивают на вортексе в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл.

Смешивают 0,5 мл эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл с 1,5 мл воды для БЭТ, перемешивают на вортексе в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 0,25 ЕЭ/мл.

Эндотоксин с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл в объеме 0,2 мл смешивают с 1,8 мл воды для БЭТ, перемешивают с помощью вихревой мешалки в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл.

Для обнаружения эндотоксина в диапазоне от 0,01 до 0,1 ЕЭ/мл:

Готовят стандартные растворы эндотоксина в концентрациях 0,01 ЕЭ/мл, 0,025 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл и 0,1 ЕЭ/мл.

Эндотоксин с концентрацией 10 ЕЭ/мл в объеме 0,2 мл смешивают с 1,8 мл воды для БЭТ, перемешивают с помощью вихревой мешалки в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл.

Эндотоксин с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл в объеме 0,2 мл смешивают с 1,8 мл воды для БЭТ, перемешивают с помощью вихревой мешалки в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл.

Эндотоксин с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл в объеме 1,0 мл смешивают с 1,0 мл воды для БЭТ, перемешивают с помощью вихревой мешалки в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 0,05 ЕЭ/мл.

Эндотоксин с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл в объеме 0,5 мл смешивают с 1,5 мл воды для БЭТ, перемешивают с помощью вихревой мешалки в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 0,025 ЕЭ/мл.

Эндотоксин с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл в объеме 0,2 мл смешивают с 1,8 мл воды для БЭТ, перемешивают с помощью вихревой мешалки в течение 1 минуты, получая эндотоксин с концентрацией 0,01 ЕЭ/мл.

3. Оставшиеся разведенные растворы эндотоксина утилизируют через 4 часа.

Приготовление АЛ-реактива и хромогенного субстрата

Внимание! Разведение выполняют непосредственно перед использованием.

1. Осторожно постукивают по флакону, чтобы порошок АЛ-реактива упал на дно флакона, добавляют 1,7 мл воды для БЭТ к лиофилизированному АЛ. Осторожно перемешивают, наклоняя и вращая флакон до тех пор, пока содержимое не перейдет в раствор. Небольшое количество порошка АЛ, оставшееся на пробке, не повлияет на проведение испытания.
2. Регидратируют хромогенный субстрат с помощью 1,7 мл воды для БЭТ.

МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЯ

Внимание! Следующие испытания необходимо проводить при температуре $37 \pm 1,0$ °C.

Перед добавлением реактива микропланшет следует предварительно нагреть в течение 10 минут на считывателе микропланшетов или в термостате сухого нагрева.

Для обнаружения эндотоксина в диапазоне от 0,01 до 0,1 ЕЭ/мл:

1. Предварительно уравнивают планшет при температуре $37 \pm 1,0$ °C в адаптере нагревательного блока.
2. Оставляя планшет при температуре $37 \pm 1,0$ °C, вносят 50 мкл воды для БЭТ (в виде холостых растворов), стандартный раствор эндотоксина в концентрациях 0,01 ЕЭ/мл, 0,025 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл и 0,1 ЕЭ/мл, и испытуемые образцы в соответствующую лунку микроплaншeтa. Запускают всю реакцию в двух параллельных пробах.

3. Вносят по 50 мкл АЛ в каждую лунку (при использовании многоканального пипеточного дозатора вносят достаточное количество АЛ в резервуар для реактивов, затем переносят по 50 мкл АЛ в каждую лунку). Немедленно хорошо перемешивают. Важно соблюдать последовательность добавления реактивов из лунки в лунку или из ряда в ряд, а также по скорости пипетирования.
 4. Устанавливают крышку планшета, оставляют планшет в нагревательном блоке на время, указанное в сертификате анализа.
 5. Пипеткой переносят соответствующий раствор хромогенного субстрата в резервуар для реагентов (дополнительно). По 100 мкл раствора хромогенного субстрата вносят в каждую лунку. Немедленно хорошо перемешивают. Порядок добавления раствора хромогенного субстрата должен соответствовать этапу 3.
 6. Устанавливают крышку микропланшета, оставляют планшет в нагревательном блоке на время, указанное в сертификате анализа.
 7. Пипеткой переносят достаточное количество стоп-реагента в резервуар для реактивов (дополнительно). После окончания времени инкубации на этапе 6 в каждую лунку вносят по 50 мкл стоп-реагента. Порядок пипетирования сохраняют таким же, как на этапе 3 и этапе 5. Немедленно хорошо перемешивают.
 8. Считывают оптическую плотность каждой лунки при длине волны 405 нм.
- В таблице ниже кратко изложена процедура испытания.

	Стандартные лунки для эндотоксина	Лунки для образца	Лунки для холостого раствора
Предварительно выдерживают планшет при температуре $37 \pm 1,0$ °C.			
Добавляют воду для БЭТ			50 мкл
Добавляют стандарт эндотоксина	50 мкл		
Добавляют образец		50 мкл	
Добавляют АЛ-реактив	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Хорошо перемешивают, инкубируя при температуре $37 \pm 1,0$ °C в течение времени (T1), указанного в сертификате анализа.			
Предварительно нагревают раствор хромогенного субстрата при температуре $37 \pm 1,0$ °C в течение 5 минут.			
Добавляют раствор хромогенного субстрата	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Хорошо перемешивают, инкубируя при температуре $37 \pm 1,0$ °C в течение времени (T2), указанного в сертификате анализа.			
Добавляют 50 мкл стоп-реагента	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Хорошо перемешивают, измеряют оптическую плотность при длине волны 405 нм.			

Для обнаружения эндотоксина в диапазоне от 0,1 до 1,0 ЕЭ/мл:

Все методики испытаний аналогичны диапазону от 0,01 до 0,1 ЕЭ/мл, за исключением этапа 2. Концентрации стандартных растворов эндотоксина составляют 0,1 ЕЭ/мл, 0,25 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл и 1,0 ЕЭ/мл. На этапе 4 и этапе 6 время инкубации должно быть изменено на указанное в сертификате анализа.

СБОР И АНАЛИЗ ДАННЫХ

1. Получают значения оптической плотности при длине волны 405 нм.
2. Строят стандартную кривую

$$Y = b X + a$$
 где
 Y – оптическая плотность, X – концентрация эндотоксина,
 b – угол наклона кривой регрессии, a – сдвиг по оси Y .

НАЧАЛЬНАЯ КВАЛИФИКАЦИЯ

В соответствии с требованиями фармакопеи валидация количественного определения содержания эндотоксинов с использованием лизата амебоцитов должна проводиться при изменении условий, которые могут повлиять на результат испытания.

1. Валидация калибровочной кривой

После получения новой серии АЛ-реактива необходимо выполнить валидационное испытание калибровочной кривой. Готовят не менее трех концентраций эндотоксина в пределах диапазона калибровочной кривой, указанного в сертификате анализа. Выполняют анализ с использованием не менее трех повторностей каждой концентрации стандартного раствора эндотоксина. В отличие от **РУТИННОГО АНАЛИЗА**, не усредняют оптическую плотность всех повторностей.

Абсолютное значение коэффициента корреляции 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 лизата амебоцитов. См. раздел **ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ РЕАКЦИИ**.

ИНГИБИРОВАНИЕ/УСИЛЕНИЕ РЕАКЦИИ

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 добавке (λm) 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) 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 и 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. Среднее значение оптической плотности для всех повторностей во время расчета. Пользователь может включить положительный контроль в качестве индикатора ингибирования или усиления реакции.

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 составлять $\geq 0,980$.
3. Оба значения оптической плотности отрицательных контрольных образцов ниже, чем у самой низкой концентрации стандартной кривой эндотоксина.
4. Коэффициент вариации (КВ) равен стандартному отклонению абсорбции, деленному на среднее значение и обычно выражается в процентах. Коэффициент вариации (%) в отношении оптической плотности повторностей должен быть менее 10.

ЦВЕТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для цветных образцов и образцов, приводящих к образованию продукта желтого цвета в кислой среде, следует использовать холостой образец. Единственное различие между холостым и испытуемым образцами заключается в замене реактива АЛ равным объемом воды для анализа БЭТ для холостого образца. Если оптическая плотность холостого образца выше 0,5, образец следует развести и повторно проанализировать.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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.