

Набор Bioendo™ КТ для определения содержания эндотоксинов (методом кинетического турбидиметрического анализа) на 800 определений

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР

KT5017S

ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

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

Методики испытаний, описанные в настоящем документе, соответствуют указанным в разделе 85 «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США.

ВНИМАНИЕ!

Только для использования *in vitro*. Не допускается применение для выявления эндотоксемии у человека.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА

Определение содержания эндотоксинов с помощью кинетического турбидиметрического анализа лизата амёбоцитов представляет собой количественный анализ для обнаружения бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Анализ проводят путем смешивания лизата амёбоцитов с испытуемым образцом с последующей регистрацией оптической плотности смеси при определенной длине волны 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.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Лиофилизированный лизат амёбоцитов (АЛ, ТАЛ или ЛАЛ) представляет собой водный экстракт циркулирующих амёбоцитов китайского мечехвоста (*Tachypleus tridentatus*). Лизат содержит каскад ферментов, сериновых протеаз (проферментов), которые могут быть активированы бактериальными эндотоксинами. Эндотоксины активируют проферменты, в результате чего образуются активированные ферменты (коагулазы). Они, в свою очередь, активируют коагулоген с образованием коагулина, а коагулин полимеризуется, формируя гелеобразный сгусток.

При формировании гелеобразного сгустка повышается оптическая плотность. 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 этого принципа можно определить концентрацию эндотоксина в испытуемом образце.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАКТИВЫ

1. Лиофилизированный лизат амёбоцитов

Каталожный № КТ17S, флакон с маркировкой синего цвета

Пятьдесят флаконов с лиофилизированным лизатом амёбоцитов по 1,7 мл каждый. АЛ-реактив получен из лизата амёбоцитов *Tachypleus tridentatus*. Лизат стабилизирован моновалентными и двухвалентными катионами. Предел обнаружения предоставленного набора для определения содержания эндотоксинов составляет 0,005 ЕЭ/мл.

Хранить при температуре 2–8 °С. Избегать длительного воздействия температуры выше 25 °С и яркого света. Восстановленный АЛ-реактив необходимо использовать в течение 10 минут.

2. Буферный раствор для восстановления

Каталожный № KTRB30, флакон с маркировкой зеленого цвета.

Пятьдесят флаконов буферного раствора для восстановления по 3,0 мл каждый. Буферный раствор для восстановления используется для регидратации лиофилизированного лизата амебоцитов. Перед использованием дают буферному раствору нагреться до комнатной температуры. Буферный раствор для восстановления следует хранить при температуре 2–8 °С.

3. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ)

Каталожный № CSE10V, флакон с маркировкой красного цвета

Десять флаконов с контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ), бактериальный штамм *E. coli* O111:B4. Каждый флакон содержит 20–199 единиц лиофилизированного эндотоксина, активность КСЭ указана в сертификате анализа. Хранить при температуре 2–8 °С. Восстановить КСЭ водой для БЭТ. Объем восстановления указан в сертификате анализа. Тщательно перемешать 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.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Одноканальные пипетки с апиrogenными наконечниками.
Многоканальная пипетка с апиrogenными резервуарами для реактивов или пипетка для многократного дозирования с апиrogenными шприцами.
2. Не содержащие эндотоксинов стеклянные пробирки для приготовления стандартного раствора эндотоксина и испытуемого образца (каталожный № T1310018, T1310005, T1310005C или аналогичные).
3. Вихревая мешалка.
4. Апиrogenные 96-луночные микропланшеты (каталожный № 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 другое термостабильное оборудование могут быть депиrogenизированы в сухожаровом шкафу с использованием валидированного процесса, стандартные минимальные настройки времени и температуры составляют 60 минут при 250 °С.

Для поддержания стерильности на протяжении всего процесса необходимо использовать асептические методы.

Испытуемые образцы следует хранить в условиях, предотвращающих бактериологическую активность. Образцы можно хранить при температуре 2–8 °С в течение менее 24 часов и при температуре ниже –10 °С в течение более длительного срока.

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.

Получают серию стандартных растворов эндотоксина путем однократного или серийного разведения, как показано в примере ниже:

1. Смешивают 0,2 мл раствора эндотоксина с концентрацией 50 ЕЭ/мл с 0,8 мл воды для БЭТ в пробирке, не содержащей эндотоксинов, перемешивают на вихревой мешалке в течение 1 минуты для получения раствора эндотоксина с концентрацией 10 ЕЭ/мл.
2. Смешивают 0,1 мл раствора эндотоксина с концентрацией 10 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 1 ЕЭ/мл.
3. Смешивают 0,1 мл раствора эндотоксина с концентрацией 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 0,1 ЕЭ/мл.
4. 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.
5. Оставшиеся разведенные растворы эндотоксина утилизируют через 4 часа.

НАСТРОЙКА МИКРОПЛАНШЕТНОГО РИДЕРА

Оборудование выдерживают при комнатной температуре в течение 15–30 минут, устанавливают температуру инкубатора 37 °С.

Настраивают шаблон и методику.

Длину волны устанавливают на уровне 340 нм, начальную ОП — 0,03.

Настраивают параметры считывания: кинетический режим в течение 2 часов с интервалом 30 секунд.

Задают среднюю скорость встряхивания планшета в течение 5 секунд до начала кинетического анализа.

МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЯ

1. Анализ начинают после того, как температура кинетического инкубатора достигнет 37 °С.
2. Проводят анализ в двух повторностях.
3. Перед загрузкой перемешивают стандартные растворы и образцы эндотоксинов на вихревой мешалке.
4. Восстанавливают содержимое каждого флакона с АЛ-реактивом с помощью указанного количества **буфера для восстановления**. Осторожно перемешивают, наклоня и вращая флакон до тех пор, пока содержимое не перейдет в раствор. Вихревую мешалку не используют. Восстановленный раствор АЛ-реактива следует использовать в течение 10 минут при комнатной температуре. Если необходимо использовать более одного флакона (два и более), их объединяют перед использованием.
5. Помещают апиогенный микропланшет на стол.
6. В каждую лунку микропланшета переносят по 100 мкл воды для БЭТ (в качестве отрицательного контроля), стандартные растворы эндотоксина и испытуемый образец. Избегают образования пузырьков воздуха.
7. Переносят АЛ-реактивы в емкость для реактивов, перемешивают, покачивая емкость из стороны в сторону. Незамедлительно добавляют 100 мкл АЛ-реактива в каждую лунку микропланшета. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку или пипетку для многократного дозирования. Избегают образования пузырьков воздуха. Оставляют микропланшет открытым.
8. Помещают микропланшет в инкубационный ридер для кинетического анализа.
9. Запускают кинетический анализ. Программа кинетического анализа должна включать этап встряхивания планшета со средней скоростью в течение 5 секунд до начала кинетического анализа для надлежащего смешивания АЛ-реактива и испытуемого образца. Регистрируют показания каждые 30 секунд в течение 120 минут при длине волны 340 нм.

СБОР И АНАЛИЗ ДАННЫХ

1. Определяют время начала реакции при ОП 0,03 и длине волны 340 нм.
2. 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 .
3. Испытание считается пройденным только при соблюдении всех следующих требований:
 - a. Абсолютное значение коэффициента корреляции (r) — $\geq 0,980$.
 - b. Время начала реакции холостого раствора больше, чем у стандартного раствора с наименьшей концентрацией.
 - c. Время начала реакции испытуемого образца находится в пределах линейного диапазона калибровочной кривой.

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:

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

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 лизата амебоцитов должна проводиться при изменении условий, которые могут повлиять на результат испытания.

1. Валидация калибровочной кривой
 После получения новой партии АЛ-реактива 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 0,01–10 ЕЭ/мл, концентрация эндотоксина в стандарте может составлять 0,01, 0,1, 1, 10 ЕЭ/мл. Выполняют анализ с использованием не менее трех повторностей каждой концентрации стандартного раствора эндотоксина. В отличие от **РУТИННЫХ ИСПЫТАНИЙ**, не следует усреднять время начала реакции для 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 ПРОДУКТА»**.

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОДУКТА

Если существует вероятность того, что образец содержит интерферирующие вещества, следует провести испытание на степень извлечения. В образец добавляют известное количество эндотоксина, концентрация эндотоксина (λm) должна находиться в середине диапазона 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.

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 расчетов усредняют время начала реакции всех растворов. Пользователь может включить положительный контроль в качестве индикатора ингибирования или усиления реакции.

ССЫЛКИ

1. Руководство по валидации ЛАЛ-теста в качестве испытания на содержание эндотоксинов в готовых парентеральных препаратах для медицинского и ветеринарного применения, биологических лекарственных препаратах и медицинских изделиях. Министерство здравоохранения и социального обеспечения США, Служба здравоохранения, Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств, декабрь 1987 г.
2. Глава 85 «Бактериальные эндотоксины». Роквилл, штат Мэриленд: Фармакопея США.
3. Bang F. B. 1956 г. Бактериальное заболевание у *Limulus Polyphemus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98: 325–351.
4. Levin J. и Bang F. B. 1964 г. Описание клеточной коагуляции у мечехвоста. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115: 337–345.
5. Levin J. и Bang F. B. 1964 г. Роль эндотоксина во внеклеточной коагуляции крови мечехвостов. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115: 265–274.
6. Levin J. и Bang F. B. 1968 г. Свертывающий белок у мечехвоста: его локализация и кинетика коагуляции эндотоксином. Thromb. Diath. Haemorrh. 19: 186–197.