



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/579 (2019.02); G01N 1/28 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2017145802, 26.12.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.12.2017

Дата регистрации:
13.06.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.12.2017

(45) Опубликовано: 13.06.2019 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

105005, Москва, ул. 2-я Бауманская, 5, стр. 1,
МГТУ им. Н.Э. Баумана, ЦЗИС, для Нелюба
(МИЦ КМ)

(72) Автор(ы):

Бессонов Иван Викторович (RU),
Морозов Алексей Сергеевич (RU),
Копицына Мария Николаевна (RU),
Даванков Вадим Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
технический университет имени Н.Э.
Баумана (национальный исследовательский
университет)" (МГТУ им. Н.Э. Баумана) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: LINDSAY G.K. et al. Single-step,
chromogenic limulus amebocyte lysate assay
for endotoxin // Journal of clinical
microbiology. - 1989. - Vol.27, No.5. - P.947-951.
LU C. et al. Ultra-fast microwave assistance
reverse microemulsion synthesis of
Fe₃O₄@SiO₂ core-shell nanoparticles as a
highly recyclable silver nanoparticles catalytic
platform in (см. прод.)

(54) Способ определения бактериального эндотоксина в биологических жидкостях

(57) Реферат:

Изобретение относится к области клинической лабораторной диагностики и представляет собой способ определения бактериального эндотоксина (БЭ) в плазме крови и моче, отличающийся тем, что предварительная подготовка образцов плазмы крови включает разбавление образцов плазмы крови физиологическим раствором в 10-100 раз и их термическую обработку при 45-85°C в течение 30-60 мин, а предварительная подготовка образцов мочи включает экстракцию мочи при помощи хлористого метилена или 1,2-дихлорэтана; после чего реакцию образцов с ЛАЛ-реактивом проводят в следующей последовательности: в стерильные пробирки

наливают 100 мкл обработанных образцов, содержащих БЭ, и туда же добавляют 100 мкл ЛАЛ-реактива, пробирки термостатируют в течение 1 часа при 37°C, для прекращения реакции в каждую пробирку добавляют по 50 мкл 50%-ной уксусной кислоты, далее проводят спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах, включающее измерение концентрации БЭ по показателю оптической плотности образца после ЛАЛ-теста на длине волны $\lambda=388$ нм. Изобретение обеспечивает снижение числа ложноположительных результатов и увеличение чувствительности при определении БЭ. 2 табл., 6

пр.

(56) (продолжение):

the reduction of 4-nitroaniline // RSC Adv. - 2016. - Vol.6. - P.88762-88769. LAUGERETTE F. et al. Endotoxemia Analysis by the Limulus Amoebocyte Lysate Assay in Different Mammal Species Used in Metabolic Studies // J Anal Bioanal. Tech. - 2015. - Vol.6, No.4. - P.251-256. MARSHALL J.C. et al. Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence // Critical Care. - 2002. - Vol.6, No.4. - P.342-348. NACHUM R. et al. Chromogenic Limulus Amoebocyte Lysate Assay for Rapid Detection of Gram-Negative Bacteriuria // Journal of clinical microbiology. - 1985. - Vol.21, No.5. - P.759-763. RU 2325645 C1, 27.05.2008.

R U 2 6 9 1 4 1 3 C 1

R U 2 6 9 1 4 1 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/579 (2019.02); *G01N 1/28* (2019.02)(21)(22) Application: **2017145802, 26.12.2017**

(24) Effective date for property rights:
26.12.2017

Registration date:
13.06.2019

Priority:

(22) Date of filing: **26.12.2017**(45) Date of publication: **13.06.2019 Bull. № 17**

Mail address:

**105005, Moskva, ul. 2-ya Baumanskaya, 5, str. 1,
MGТУ im. N.E. Baumana, TSZIS, dlya Nelyuba
(MITS KM)**

(72) Inventor(s):

**Bessonov Ivan Viktorovich (RU),
Morozov Aleksej Sergeevich (RU),
Kopitsyna Mariya Nikolaevna (RU),
Davankov Vadim Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
tehnicheskij universitet imeni N.E. Baumana
(natsionalnyj issledovatel'skij universitet)"
(MGТУ im. N.E. Baumana) (RU)**

(54) METHOD FOR DETERMINING BACTERIAL ENDOTOXIN IN BIOLOGICAL FLUIDS

(57) Abstract:

FIELD: clinical laboratory diagnostics.

SUBSTANCE: invention relates to clinical laboratory diagnostics and represents a method for determining bacterial endotoxin (BE) in blood plasma and urine, characterized by that preliminary preparation of blood plasma samples involves dilution of blood plasma samples with a physiological solution in 10–100 times and their heat treatment at 45–85 °C for 30–60 minutes, and preliminary preparation of urine samples involves urine extraction using methylene chloride or 1,2-dichloroethane; after which the reaction of the samples with the LAL reagent is carried out in the following sequence: 100 mcl of treated samples

containing BE are poured into sterile test tubes, and there added is 100 mcl of LAL reagent, the tubes are thermostated for 1 hour at 37 °C to terminate the reaction, 50 mcl of 50 % acetic acid is added to each tube, followed by spectrophotometric determination of BE concentration in samples, including measurement of BE concentration as to optical density of sample after LAL-test at wavelength $\lambda=388$ nm.

EFFECT: invention provides reducing the number of false-positive results and increasing sensitivity when determining BE.

1 cl, 2 tbl, 6 ex

Область техники

Изобретение относится к области медицины и клинической лабораторной диагностики. Более подробно изобретение относится к способу (методу) определения уровня эндотоксина, основанному на реакции *in vitro* между бактериальным эндотоксином (БЭ) и ЛАЛ-реактивом в биологических жидкостях (плазме крови и моче и т.п.).

Уровень техники

Известен ряд способов (методов) определения бактериальных эндотоксинов (БЭ) в биологических жидкостях, например, по следующим патентным документам: патенту РФ RU 2325645 (МПК G01N 33/48, G01N 33/579, опубл. 27.05.2008 Бюл. №15), японскому патенту JP 4761448 (МПК G01N 33/48; G01N 33/579, опубл. 2011-08-31), японской патентной заявке JP 2003232794 (МПК G01N 33/579, опубл. 2003-08-22), китайскому патенту CN 1696636 (МПК G01N 1/28, опубл. 2005-11-16), международной РСТ-заявке WO 2009005231 (МПК G01N 33/49, G01N 33/579, опубл. 2009-01-08).

По патенту RU 2325645 СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТАЛ-ТЕСТА, В КОТОРОМ РЕГИСТРАЦИЮ ОБРАЗОВАНИЯ ПОЛИМЕРА КОАГУЛОГЕНА ПРОИЗВОДЯТ ПО СТРУКТУРЕ ОБРАЗУЮЩИХСЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКТАЛОВ, проводят в биологических средах и лекарственных средствах. Сущность способа:

смешивают тахплеус лизат (ТАЛ) и разведения исследуемого образца нанесением на апиrogenную поверхность, инкубируют с закрытой крышкой в течение 30...60 мин при 37°C, выдерживают апиrogenную поверхность в термостате при открытой крышке до высыхания капель смеси реагентов, регистрируют образование полимера коагулогена под увеличением по образующимся белковым фракталам и при их наличии определяют активность эндотоксина в последнем разведении.

Недостатком способа является его невысокая точность из-за субъективного визуального контроля результатов теста, в отличие от измерения оптической плотности в результате хромогенного анализа, использующегося в предлагаемом способе. Кроме того, использование ТАЛ-реагента (лизат мечехвостов вида *Tachypleus tridentatus*) также накладывает определенные ограничения на его применение, в связи со сложностью его приобретения на территории РФ (необходимо ждать поставок из Китая), в отличие от ЛАЛ-реактива, который широко и активно применяется повсеместно.

Способ по патенту JP 4761448 BLOOD ENDOTOXIN MEASURING METHOD направлен на количественное измерение эндотоксина в крови, которое не может быть получено обычными методами, и уточняет связь между количеством эндотоксина в крови и клиническим состоянием. В способе отделяются только эритроциты и удаляются из цельной крови, а количество эндотоксина, содержащегося в оставшейся частице крови, измеряется, тем самым корректируя эндотоксин, содержащийся в лейкоцитах и эндотоксине, содержащемся в плазме.

Недостатком способа является возможность его применения исключительно для анализа крови, в отличие от предлагаемого способа, позволяющего оценивать содержание БЭ в разных биологических жидкостях.

Способ по патентной заявке JP 2003232794 METHOD FOR MEASURING ENDOTOXIN ACTIVITY предназначен для точного и быстрого измерения активности эндотоксина методом ЛАЛ-теста (реагент *Limulus Amebocyte Lysate* (лимулус лизат, сокращенно ЛАЛ) с применением предварительной обработки образца, которая включает в себя стадии добавления поверхностно-активного вещества в образец с последующей ультразвуковой обработкой. Поверхностно-активное вещество представляет собой

анионное вещество, его концентрация в образце составляет менее 0,01%. Измерение содержания бактериального эндотоксина проводят методом турбидиметрического ЛАЛ-теста.

Особенностью этого способа является специфичная предварительная обработка, существенно отличающаяся от обработки, используемой в предлагаемом способе.

Аналог по подготовке образцов крови для тестирования БЭ - способ по патенту CN 1696636 METHOD FOR PREPARING BLOOD FOR TESTING ENDOTOXIN OF BACTERIA включает приготовление сыворотки крови, добавление нескольких раз 0,1...0,3% qulatong (X-100) в небольшое количество сыворотки крови, нагревание в водяной бане, обработку в ледяной бане, разбавление апиrogenной водой и смешивание небольшого количества разбавленной жидкости с таким же количеством реагента лизата *Tachypleus tridentatus* для получения кровяного продукта, который используется для обнаружения бактериальных эндотоксинов.

Недостатком способа является сложность предварительной обработки образцов для исследования, а также узость его применения только в крови, а не в разных биологических жидкостях, как в предлагаемом способе. Кроме того, также, как и в патенте RU 2325645 в качестве реагента для определения используется лизат, выделенный из мечехвостов вида *Tachypleus tridentatus*, в отличие от применяемого в нашем изобретении лизата амёбоцитов *Limulus Polyphemus*, являющегося более распространенным и легкодоступным реагентом.

Способ по PCT-заявке WO 2009005231 METHODS FOR QUANTITATIVELY DETERMINING ENDOTOXIN (количественного определения эндотоксина в биологическом образце) включает в себя этапы: (а) получение биологического образца; (б) термическая обработка биологического образца; (в) получение реакционного раствора путем добавления ЛАЛ-реагента (реагента *Limulus Amebocyte Lysate* (сокращенно ЛАЛ) в инактивированный биологический образец; и (г) измерение значения оптической плотности реакционного раствора после определенного времени реакции или измерения времени, когда раствор достигает заданного значения оптической плотности. С помощью изобретения можно определять количество эндотоксина в биологическом образце более точным и удобным образом.

Основным недостатком этого способа является использование турбидиметрического ЛАЛ-теста (кинетического и по конечной точке). Такая модификация ЛАЛ-теста требует дорогостоящего и узкоспецифичного оборудования - микропланшетного ридера для регистрации изменения оптической плотности, вызванной помутнением исследуемых образцов. В отличие от этого в предлагаемом способе определение содержания БЭ происходит при помощи хромогенного ЛАЛ-теста, что позволяет использовать любой лабораторный спектрофотометр.

Раскрытие изобретения

Задачей изобретения является разработка более универсального способа, пригодного для количественного определения БЭ в разных видах биологических жидкостей, в т.ч. в плазме крови и в моче, используя метод хромогенного ЛАЛ-теста для определения БЭ со специфичной предварительной обработкой образцов из разных видов биологических жидкостей. Преимуществом хромогенного метода анализа является отсутствие необходимости использовать дорогостоящее оборудование, а также высокая чувствительность и специфичность метода.

Задача решается способом определения бактериального эндотоксина в биологических жидкостях, характеризующимся зависящей от вида биологической жидкости предварительной подготовкой образцов для последующего хромогенного ЛАЛ-теста,

проведение реакции подготовленных образцов с ЛАЛ-реактивом и спектрофотометрическое определение концентрации бактериального эндотоксина в образцах после реакции с ЛАЛ-реактивом, при этом реакция образцов с ЛАЛ-реактивом включает: внесение в стерильные пробирки 100 мкл обработанных образцов биологических жидкостей, загрязненных эндотоксином, и добавление 100 мкл ЛАЛ-реактива (прим.: в реальных анализах заранее наведенные растворы с известными концентрациями БЭ используют в качестве калибровочной кривой. При анализе биологической жидкости больного, в которой необходимо определить содержание БЭ, она обрабатывается по методике, описанной в примерах осуществления способа. В результате определяется значение оптической плотности при длине волны 388 нм (этой длине волны соответствует максимум поглощения комплекса хромогенного ЛАЛ субстрата с БЭ), далее это значение сравнивается со значениями, полученными для конкретных концентраций эндотоксина, и делается вывод, сколько БЭ было в биологической жидкости больного). Пробирки были термостатированы в течение 1 часа при 37°C. Для прекращения реакции в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл 50% уксусной кислоты; спектрофотометрическое определение концентрации бактериального эндотоксина в образцах включает измерение концентрации БЭ по показателю оптической плотности образца после ЛАЛ-теста на длине волны $\lambda=388$ нм. При этом в реальных анализах и моделирующих экспериментах всегда делается ЛАЛ тест на каждом образце не менее чем в 3 повторностях.

Предварительная подготовка образцов из плазмы крови включает разбавление образцов плазмы крови физиологическим раствором в 10...100 раз и последующую термическую обработку при 45...85°C в течение 30...60 мин. При этом после проведения ЛАЛ-теста в ходе спектрофотометрического определения концентрации БЭ в образцах плазмы крови при помощи термической обработки и разведения возможно определение наличия БЭ в растворе с концентрацией БЭ на границе между 0,005 ЕЭ/мл и 0,010 ЕЭ/мл и с более высокими концентрациями БЭ.

Предварительная подготовка образцов из мочи включает экстракцию мочи при помощи хлорорганического растворителя, включающего, но не ограничивающегося одним из следующих: хлористый метилен, 1,2-дихлорэтан. При этом после проведения ЛАЛ-теста в ходе спектрофотометрического определения концентрации БЭ в образцах мочи при помощи экстракции хлор-органическим растворителем возможно определение наличия БЭ в растворе с концентрацией БЭ на границе между 1,00 ЕЭ/мл и 2,00 ЕЭ/мл и с более высокими концентрациями БЭ.

Идея предлагаемого способа заключается в том, что фермент фактор С, содержащийся в лизате амёбоцитов мечехвостов *Limulus Amebocyte Lysate* (ЛАЛ-реагент), реагирует с БЭ, что запускает каскад ферментативных реакций, приводящий к активации свертывающего фермента. Этот фермент в свою очередь гидролизует особый хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта. Регистрация сигнала происходит спектрофотометрически по изменению оптической плотности (т.е. по интенсивности окраски).

Преимущества предлагаемого способа от найденных аналогов следующие:

1) RU 2325645 - предлагаемый метод является более точным и позволяет количественно определять содержание бактериального эндотоксина в биологических жидкостях, благодаря применению хромогенной модификации ЛАЛ-теста в отличие от визуального контроля, использующегося авторами в данном патенте;

2) JP 761448 (B2) - преимущество предлагаемого способа в большей универсальности, так как в японском методе определяют бактериальный эндотоксин только в крови,

тогда как в предлагаемом способе не только в крови и плазме крови, но и в моче, т.е. более широко применимый, универсальный способ;

3) JP 2003232794 (A) - метод, используемый авторами в данном патенте, позволяет проводить определение БЭ в специфичных условиях применения, существенно отличных от признаков предлагаемого способа.

4) CN 1696636 (A) - близкий¹ аналог предварительной обработки образцов крови, включающая в себя обработку раствором тритон X-100, нагревание-охлаждение и разбавление. Отличие от предлагаемого способа: а) другие концентрации реагента тритон X-100; б) другие температуры охлаждения; и в предлагаемом способе это разные методики: либо нагревание и разбавление, либо обработка тритон X-100, с последующей кислотнo-щелочной обработкой образцов, тогда как в приведенном патенте все операции необходимо применять к каждому образцу (усложнение), по сравнению с предлагаемым способом требуется больше стадий по предварительные обработки крови. Кроме того, также описывается определение БЭ только в крови (сыворотке крови).

5) WO 2009005231 (A1) - по сравнению с данным методом, из преимуществ предлагаемого способа можно указать, что определение содержания БЭ происходит при помощи хромогенного ЛАЛ-теста, что позволяет использовать любой сравнительно недорогой и доступный лабораторный спектрофотометр.

Примеры осуществления изобретения Примеры 1, 2, 3 - для образцов плазмы крови, примеры 4, 5, 6 - для образцов мочи. Общими приемами для всех примеров являлись проведение реакции подготовленных образцов с ЛАЛ-реактивом и спектрофотометрическое определение концентрации бактериального эндотоксина в образцах после реакции с ЛАЛ-реактивом.

Пример 1.

1. Приготовление раствора бактериального эндотоксина

Стандарт бактериального эндотоксина был разбавлен 3,4 мл апирогенной воды и получена концентрация 50 ЕЭ/мл.

2. Подготовка плазмы

Образцы крови были отцентрифугированы при 1200 g в течение 10 минут. Отделенная плазма была отобрана в стерильные пробирки 10×75 мм.

3. Загрязнение плазмы

Образцы плазмы были загрязнены раствором бактериального эндотоксина (50 ЕЭ/мл) до концентрации последнего соответственно: 5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0025 ЕЭ/мл.

4. Обработка образцов

А) В стерильных пробирках к 0,1 мл плазмы было добавлено 0,9 мл физиологического раствора хлорида натрия. Таким образом, кровь была разведена в 10 раз.

Б) Пробирки были термостатированы при 45°C в течение 60 минут (при термостатировании их не закрывают).

5. Проведение реакции с ЛАЛ-реактивом

В стерильные пробирки было налито 100 мкл обработанных образцов, загрязненных до определенных концентраций эндотоксина, и туда же добавлено 100 мкл ЛАЛ-реактива. Также был образец сравнения: это 100 мкл не загрязненной плазмы и 100 мкл ЛАЛ-реактива. Все концентрации и образец сравнения были приготовлены в 3 повторностях. Пробирки были термостатированы в течение 1 часа при 37°C. Для прекращения реакции в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл 50% уксусной кислоты.

6. Спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах

Концентрацию эндотоксина измеряли по показателю оптической плотности на длине

волны $\lambda=388$ нм.

7. Результаты анализа

Пробирки с отрицательным контролем (незагрязненная плазма) после часа термостатирования при 37°C, а также пробирки, содержащие 0,005; 0,0025 ЕЭ/мл остались прозрачными. В пробирках с содержанием бактериального эндотоксина в концентрации 5,00; 0,50. 0,05, 0,01 ЕЭ/мл раствор окрасился в желтый цвет. Оптическая плотность для каждой концентрации при $\lambda=388$ нм определялась как среднее значение из трех повторностей (таблица 1).

Таблица 1 - Определение БЭ методом хромогенного ЛАЛ-теста в плазме.

| Концентрация бактериального эндотоксина, ЕЭ/мл | Значение оптической плотности при 388 нм | Результат анализа |
|--|--|-------------------------|
| 0 | 0,05 | БЭ не обнаружены |
| 0,0025 | 0,07 | БЭ не обнаружены |
| 0,005 | 0,10 | БЭ не обнаружены |
| 0,010 | 0,41 | БЭ обнаружены |
| 0,050 | 0,51 | БЭ обнаружены |
| 0,500 | 0,53 | БЭ обнаружены |
| 5,00 | 0,54 | БЭ обнаружены |

Таким образом, в плазме крови при помощи термической обработки и разведения возможно определение наличия БЭ в растворе с концентрацией БЭ на границе между 0,005 ЕЭ/мл и 0,010 ЕЭ/мл и с более высокими концентрациями БЭ.

Пример 2.

1. Приготовление раствора бактериального эндотоксина

Стандарт бактериального эндотоксина был разбавлен 3,4 мл апиrogenной воды и получена концентрация 50 ЕЭ/мл.

2. Подготовка плазмы

Образцы крови были отцентрифугированы при 1200g в течение 10 минут. Отделенная плазма была отобрана в стерильные пробирки 10×75 мм.

3. Загрязнение плазмы:

Образцы плазмы были загрязнены раствором бактериального эндотоксина (50 ЕЭ/мл) до концентрации последнего соответственно: 5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0025 ЕЭ/мл.

4. Обработка образцов

А) В стерильных пробирках к 0,1 мл плазмы было добавлено 4,9 мл физиологического раствора хлорида натрия. Таким образом, кровь была разведена в 50 раз.

Б) Пробирки были термостатированы при 60°C в течение 30 минут.

5. Проведение реакции с ЛАЛ-реактивом

В стерильные пробирки было налито 100 мкл обработанных образцов, загрязненных до определенных концентраций эндотоксина, и туда же добавлено 100 мкл ЛАЛ-реактива. Также был образец сравнения: это 100 мкл не загрязненной плазмы и 100 мкл ЛАЛ-реактива. Все концентрации и образец сравнения были приготовлены в 3 повторностях. Пробирки были термостатированы в течение 1 часа при 37°C. Для прекращения реакции в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл 50% уксусной кислоты.

6. Спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах

Концентрацию эндотоксина измеряли по показателю оптической плотности на длине волны $\lambda=388$ нм.

7. Результаты анализа аналогичны результатам анализа примера 1.

5 Пример 3.

1. Приготовление раствора бактериального эндотоксина

Стандарт бактериального эндотоксина был разбавлен 3,4 мл апирогенной воды и получена концентрация 50 ЕЭ/мл.

2. Подготовка плазмы

10 Образцы крови были отцентрифугированы при 1200g в течение 10 минут. Отделенная плазма была отобрана в стерильные пробирки 10×75 мм.

3. Загрязнение плазмы

Образцы плазмы были загрязнены раствором бактериального эндотоксина (50 ЕЭ/мл) до концентрации последнего соответственно: 5, 0,5, 0,05, 0,005, 0,0025 ЕЭ/мл.

15 4. Обработка образцов

А) В стерильных пробирках к 0,1 мл плазмы было добавлено 9,9 мл физиологического раствора хлорида натрия. Таким образом, кровь была разведена в 100 раз.

Б) Пробирки были термостатированы при 85°C в течение 60 минут.

5. Проведение реакции с ЛАЛ-реактивом

20 В стерильные пробирки было налито 100 мкл обработанных образцов, загрязненных до определенных концентраций эндотоксина, и туда же добавлено 100 мкл ЛАЛ-реактива. Также был образец сравнения: это 100 мкл не загрязненной плазмы и 100 мкл ЛАЛ-реактива. Все концентрации и образец сравнения были приготовлены в 3 повторностях. Пробирки были термостатированы в течение 1 часа при 37°C. Для
25 прекращения реакции в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл 50% уксусной кислоты.

6. Спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах Концентрацию эндотоксина измеряли по показателю оптической плотности на длине волны $\lambda=388$ нм.

7. Результаты анализа аналогичны результатам анализа примера 1.

30 Пример 4.

1. Приготовление раствора бактериального эндотоксина:

Стандарт бактериального эндотоксина был разбавлен 3,4 мл апирогенной воды и получена концентрация 50 ЕЭ/мл.

2. Загрязнение мочи:

35 Образцы мочи были загрязнены раствором бактериального эндотоксина (50 ЕЭ/мл) до концентрации последнего соответственно: 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05 ЕЭ/мл.

3. Обработка образцов.

А) В стерильных пробирках к 1 мл мочи было добавлено 0,25 мл хлороформа и смесь была перемешана на вибрационном встряхивателе в течение 4 часов.

40 Б) Содержимое пробирок было отцентрифугировано при 4000 об/мин в течение 10 минут. Средний мутный слой был отобран и использовался для проведения ЛАЛ-теста.

4. Проведение реакции с ЛАЛ-реактивом:

45 В стерильные пробирки было налито 100 мкл обработанных образцов, загрязненных до определенных концентраций эндотоксина, и туда же добавлено 100 мкл ЛАЛ-реактива. Также был образец сравнения: это 100 мкл незагрязненной плазмы и 100 мкл ЛАЛ-реактива. Все концентрации и образец сравнения были приготовлены в 3 повторностях. Пробирки были термостатированы в течение 1 часа при 37°C. Для прекращения реакции в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл 50% уксусной

кислоты.

5. Спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах Концентрацию эндотоксина измеряли по показателю оптической плотности на длине волны $\lambda=388$ нм.

6. Результаты анализа

- 5 Пробирки с отрицательным контролем (незагрязненная моча) после часа термостатирования при 37°C , а также пробирки, содержащие 0,5; 0,1; 0,05 ЕЭ/мл. остались прозрачными. В пробирках с содержанием бактериального эндотоксина в концентрации 5,0; 2,0; 1,0 ЕЭ/мл раствор окрасился в желтый цвет. Оптическая плотность для каждой концентрации при $\lambda=388$ нм определялась как среднее значение из трех
10 повторностей (таблица 2).

Таблица 2 - Определение БЭ методом хромогенного ЛАЛ-теста в моче.

| | | | |
|----|---|---|--------------------------|
| 15 | Концентрация бактериального эндотоксина, ЕЭ/мл | Значение оптической плотности при 388 нм | Результат анализа |
| | 0 | 0,06 | БЭ не обнаружены |
| | 0,05 | 0,05 | БЭ не обнаружены |
| 20 | 0,1 | 0,06 | БЭ не обнаружены |
| | 0,5 | 0,07 | БЭ не обнаружены |
| | 1,00 | 0,10 | БЭ не обнаружены |
| | 2,00 | 0,53 | БЭ обнаружены |
| 25 | 5,00 | 0,54 | БЭ обнаружены |

Таким образом, в моче при помощи экстракции хлор-органическим растворителем возможно определение наличия БЭ в растворе с концентрацией БЭ на границе между 1,00 ЕЭ/мл и 2,00 ЕЭ/мл и с более высокими концентрациями БЭ.

Пример 5.

- 30 1. Приготовление раствора бактериального эндотоксина:

Стандарт бактериального эндотоксина был разбавлен 3,4 мл апиrogenной воды и получена концентрация 50 ЕЭ/мл.

2. Загрязнение мочи:

- 35 Образцы мочи были загрязнены раствором бактериального эндотоксина (50 ЕЭ/мл) до концентрации последнего соответственно: 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05 ЕЭ/мл.

3. Обработка образцов.

А) В стерильных пробирках к 1 мл мочи было добавлено 0,25 мл хлористого метилена и смесь была перемешана на вибрационном встряхивателе в течение 4 часов.

- 40 Б) Содержимое пробирок было отцентрифугировано при 4000 об/мин в течение 10 минут. Средний мутный слой был отобран и использовался для проведения ЛАЛ-теста.

4. Проведение реакции с ЛАЛ-реактивом:

- В стерильные пробирки было налито 100 мкл обработанных образцов, загрязненных до определенных концентраций эндотоксина, и туда же добавлено 100 мкл ЛАЛ-реактива. Также был образец сравнения: это 100 мкл не загрязненной плазмы и 100
45 мкл ЛАЛ-реактива. Все концентрации и образец сравнения были приготовлены в 3 повторностях. Пробирки были термостатированы в течение 1 часа при 37°C . Для прекращения реакции в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл 50% уксусной кислоты.

5. Спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах Концентрацию эндотоксина измеряли по показателю оптической плотности на длине волны $\lambda=388$ нм.

6. Результаты анализа аналогичны результатам анализа примера 4.

Пример 6.

1. Приготовление раствора бактериального эндотоксина:

Стандарт бактериального эндотоксина был разбавлен 3,4 мл апиrogenной воды и получена концентрация 50 ЕЭ/мл.

2. Загрязнение мочи:

Образцы мочи были загрязнены раствором бактериального эндотоксина (50 ЕЭ/мл) до концентрации последнего соответственно: 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,1; 0,05 ЕЭ/мл.

3. Обработка образцов.

А) В стерильных пробирках к 1 мл мочи было добавлено 0,3 мл 1,2-дихлорэтана и смесь была перемешана на вибрационном встряхивателе в течение 4 часов.

Б) Содержимое пробирок было отцентрифугировано при 4000 об/мин в течение 10 минут Средний мутный слой был отобран и использовался для проведения ЛАЛ-теста.

4. Проведение реакции с ЛАЛ-реактивом:

В стерильные пробирки было налито 100 мкл обработанных образцов, загрязненных до определенных концентраций эндотоксина, и туда же добавлено 100 мкл ЛАЛ-реактива. Также был образец сравнения: это 100 мкл не загрязненной плазмы и 100 мкл ЛАЛ-реактива. Все концентрации и образец сравнения были приготовлены в 3 повторностях. Пробирки были термостатированы в течение 1 часа при 37°C. Для прекращения реакции в каждую пробирку было добавлено по 50 мкл 50% уксусной кислоты.

5. Спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах Концентрацию эндотоксина измеряли по показателю оптической плотности на длине волны $\lambda=388$ нм.

6. Результаты анализа аналогичны результатам анализа примера 4.

Предлагаемый способ разработан и апробирован в рамках выполнения работы по Соглашению №14.577.21.0165 между Министерством образования и науки Российской Федерации (Госзаказчик) и МГТУ им. Н.Э.Баумана.

(57) Формула изобретения

Способ определения бактериального эндотоксина (БЭ) в плазме крови и моче, включающий предварительную подготовку образцов, зависящую от вида биологической жидкости, проведение реакции подготовленных образцов с ЛАЛ-реактивом и спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах после реакции с ЛАЛ-реактивом, отличающийся тем, что предварительная подготовка образцов плазмы крови включает разбавление образцов плазмы крови физиологическим раствором в 10-100 раз и их термическую обработку при 45-85°C в течение 30-60 мин, а предварительная подготовка образцов мочи включает экстракцию мочи при помощи хлористого метилена или 1,2-дихлорэтана; после чего реакцию образцов с ЛАЛ-реактивом проводят в следующей последовательности: в стерильные пробирки наливают 100 мкл обработанных образцов, содержащих БЭ, и туда же добавляют 100 мкл ЛАЛ-реактива, пробирки термостатируют в течение 1 часа при 37°C, для прекращения реакции в каждую пробирку добавляют по 50 мкл 50%-ной уксусной кислоты, далее проводят спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах, включающее измерение концентрации БЭ по показателю оптической плотности образца после ЛАЛ-теста на длине волны $\lambda=388$ нм.