



(51) МПК

G01N 33/579 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

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:
26.12.2017Дата 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

Р 2 6 9 1 4 1 3 С 1

Р 2 6 9 1 4 1 3 С 1

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,
MGTU 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 byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
tekhnicheskij universitet imeni N.E. Baumana
(natsionalnyj issledovatelskij universitet)"
(MGTU im. N.E. Baumana) (RU)

R U
2 6 9 1 4 1 3
C 1
C 3
C 4
C 1
C 2
R U

(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 апирогенную поверхность, инкубируют с закрытой крышкой в течение 30...60 мин при 37°C, выдерживают апирогенную 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,

5 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 (Х-100) в небольшое количество сыворотки крови, нагревание в водяной бане, обработку 10 в ледяной бане, разбавление апирогенной водой и смещивание 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

15 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 амебоцитов *Limulus Polyphemus*, являющегося более 20 распространенным и легкодоступным реагентом.

Способ по РСТ-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 25 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 30 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 35 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 40 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 45 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

- 5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 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 25 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 30 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.

35 Идея предлагаемого способа заключается в том, что фермент фактор С, содержащийся в лизате амебоцитов 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 40 происходит спектрофотометрически по изменению оптической плотности (т.е. по интенсивности окраски).

Преимущества предлагаемого способа от найденных аналогов следующие:

45 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 специфических 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 кислотно-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 осуществление 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 отцентрифужированы 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 терmostатированы при 45°C в течение 60 минут (при терmostатировании 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 терmostатированы 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 апирогенной воды и получена концентрация 50 ЕЭ/мл.

2. Подготовка плазмы

Образцы крови были отцентрифужированы 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.

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

Образцы крови были отцентрифужированы при 1200г 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 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

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.

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:

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.

Б) Содержимое пробирок было отцентрифужировано 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 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.

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
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
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 апирогенной 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 0,25 мл хлористого метилена 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.

40 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.

Пример 6.

5. Приготовление раствора бактериального эндотоксина:

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

2. Загрязнение мочи:

Образцы мочи были загрязнены раствором бактериального эндотоксина (50 ЕЭ/мл)

10 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 отцентрифужировано при 4000 об/мин в течение 10

15 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

20 мкл ЛАЛ-реактива. Все концентрации и образец сравнения были приготовлены в 3 повторностях. Пробирки были терmostатированы 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

25 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.

30

(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

35 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

40 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 терmostатируют в течение 1 часа при 37°C, для прекращения реакции в каждую пробирку добавляют по 50 мкл 50%-ной уксусной кислоты, далее проводят

45 спектрофотометрическое определение концентрации БЭ в образцах, включающее измерение концентрации БЭ по показателю оптической плотности образца после ЛАЛ-теста на длине волны $\lambda=388$ нм.