

## Выбор планшета для проведения фотометрических анализов.

Часто перед пользователями, начинающими осваивать проведение анализа на Бактериальные эндотоксины фотометрическими методами на специализированном спектрофотометре, стоит задача подбора важного вспомогательного материала – микропланшета для инкубирования реакционных смесей.

Типов планшет на современном рынке достаточно много, область их применения распространяется от микробиологии до иммунологических исследований. Чаще всего не удается найти микропланшет, имеющий маркировку «для проведения ЛАЛ-теста», т.к. она означает очень узкую специализацию данного материала.



Однако существует несколько параметров, по которым можно выбрать материал, удовлетворяющий методике проведения фотометрического анализа по показателю Бактериальные эндотоксины. К таким параметрам мы рекомендуем отнести:

**Апирогенность** – пожалуй, главный критерий для выбора планшет, т.к. важно при постановке анализа не привнести, вместе с материалом, загрязнение проверяемого испытуемого раствора эндотоксинами;

**Стерильность** – следует обратить внимание на данную категорию планшет, если недоступны данные о апирогенности;

**Поверхность лунок** – у некоторых типов планшет поверхность лунок может быть обработана гидрофобными веществами, что может привести к ложноотрицательным или

ложноположительным результатам анализа, поэтому для проведения ЛАЛ-теста необходимо выбрать планшет без дополнительной обработки поверхности лунок.

**Количество лунок** – оптимально остановить свой выбор на 96-луночных планшетах;

**Объём лунки** – т.к. объем реакционной смеси в ЛАЛ-тесте составляет всего 0,2 мл, то по данному параметру подойдут микропланшеты с рабочим объемом лунки не менее 0,3 мл и не более 0,4 мл;

**Форма лунок** – для проведения ЛАЛ-теста рекомендуем использовать планшеты с плоскодонной формой лунок («П – форма») для того, чтобы считывание оптической плотности спектрофотометром происходило через равный столб жидкости, минимизируя искажение проходящего через лунку с реакционной смесью пучка света.

**Материал планшета** – ограничений по выбору материала, из которого изготовлен планшет строго говоря нет, т.к. анализ фотометрическими методами обычно длится менее 60 минут при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , а при данных условиях и полистирол (PS), и полиэтилен (PE), и полипропилен (PP) сохраняют индифферентные свойства.

**Крышка** – комплектация крышкой обеспечивает плотное прикрытие рабочей поверхности планшета и предотвращение возможного загрязнения лунок, когда необходим перерыв в работе или в период времени до постановки следующего опыта. Плотная и точная фиксация крышки на планшете достигается уплотнительными кольцами на внутренней поверхности крышки и приподнятыми краями лунок.

**Буквенно-цифровая маркировка лунок** – наличие данной особенности в значительной степени упрощает работу аналитика в части планирования опыта и ориентировки при добавлении испытуемых растворов и реактивов.

**Эргономичность** – ребристая поверхность боковых стенок корпуса планшета позволяет обеспечить прочное удержание планшета аналитиком при переносе с рабочей поверхности в прибор для считывания. Это особенно важно, т.к. касание нижней части планшета может привести к погрешности при считывании оптической плотности во время анализа!

**Индивидуальная упаковка** – гарантия заявленных характеристик производителем и удобство при хранении пользователем достигается в том случае, если каждый планшет защищен плотной индивидуальной упаковкой, например, из прозрачного пластика.

Безусловно, все эти характеристики имеют практическое значение, но понятно, что наиболее существенной характеристикой планшетов, используемых для проведения ЛАЛ-теста, безусловно является апиrogenность или содержание эндотоксинов. Надо отметить, что по этому параметру наблюдается большое разнообразие характеристик, и часто выставленный критерий непонятен никому, кроме производителя.

В качестве примера в таблице 1 приведены фрагменты из спецификаций:

*Таблица 1. Фрагменты спецификаций на планшеты разных производителей*

<b>Производитель, модель</b>	<b>Описание раздела «апиrogenность» или содержание эндотоксинов</b>
Corning 3599	Tested and met the criteria established in current version of ANSI/AAMI ST 72, “Bacterial Endotoxins - Test methodologies, routine monitoring, and alternatives to batch testing” and USP <85>, “Bacterial Endotoxins Test”. <b>The acceptance level for product is <math>\leq 0.10</math> EU/ml or <math>\leq 4</math> EU/device.</b>
Nunc 165199	USP <85> Bacterial Endotoxins Test <b>&lt; 0.5 Endotoxins units/ml</b>
SPL 30096	Products are tested non-pyrogenic (LAL test) <b>to a limit of less than 0.01 EU/ml (0.4 EU/device)</b> per USP <85>
Biofil TCP001096	Products labeled non-pyrogenic have been validated per FDA guidelines on LAL (Limulus Amebocyte Lysate) testing for medical devices and company guidelines. <b>The acceptance level for product is less than 0.5 EU/mL.</b>

Какой планшет выбрать для проведения кинетического хромогенного или турбидиметрического метода, если предел определения равен 0,005 ЕЭ/мл? Какой планшет лучше - у которого содержание 0,5 ЕЭ/мл или 0,1 ЕЭ/мл? Или выбирать между планшетами с содержанием эндотоксина менее 4 ЕЭ/изделие или 0,4 ЕЭ/изделие?

Ситуация настолько распространенная, что она нашла свое отражение даже в рекомендательной статье по правилам валидации ЛАЛ-теста в Американской фармакопее (USP <1085> Guidelines on the Endotoxins Test):

*Таблица 2. Выдержка из Американской фармакопеи, ст.1085 «Руководящие указания по проведению ЛАЛ-теста» (перевод)*

*Если лаборатория принимает сертификат анализа поставщика на содержание бактериальных эндотоксинов, необходимо понимать методы, используемые для определения сообщаемого результата испытания. Ниже приведены два примера сертификатов анализа.*

- *Если от поставщика получена партия пробирок для разведений, заявленных в качестве «апирогенных», что это фактически означает? Для партии было проведено испытание на пирогенность на кроликах или валидированное испытание активации моноцитов? Испытание выполнили с соблюдением стандартов статьи (85)? Если да, то при каком уровне бактериальных эндотоксинов поставщик считает материал «апирогенным»? Важно уточнить у поставщика, каким образом были выполнены подготовка материала и испытания.*

- *Если от поставщика получена партия пробирок вместимостью 10 мл с этикеткой «< 0,5 ЕЭ/мл», то что это означает? Какой объем использован для проведения экстракции материала пробирки (1, 5 или 10 мл)? 1 мл экстрагента будет соответствовать < 0,5 ЕЭ/пробирка, тогда как 5 мл экстрагента будет соответствовать < 2,5 ЕЭ/пробирка и 10 мл экстрагента будет соответствовать < 5 ЕЭ/пробирка. Лаборатория должна уточнить у поставщика метод экстракции бактериальных эндотоксинов из материала пробирки, а также условия теста на БЭТ, использовавшихся при получении результата.*

Следовать рекомендации по уточнению деталей проверки у поставщика не всегда получается. В конечном итоге пользователь должен сам определить и обосновать критерии выбора данного вспомогательного материала. Надеемся, что данная статья в некоторой степени поможет пользователям ЛАЛ-теста в решении этой задачи.