

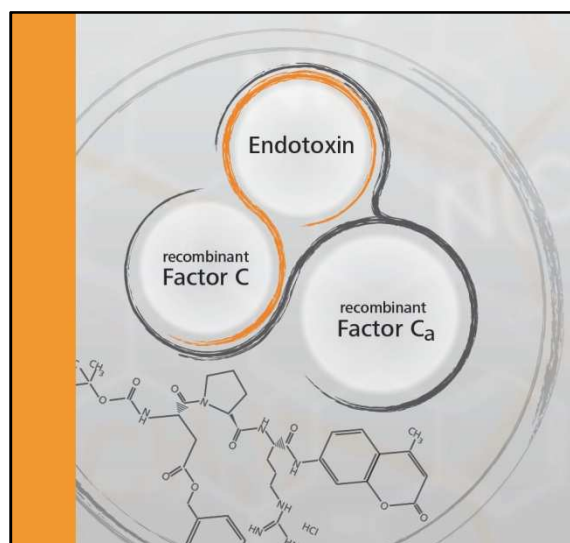
# Produktinformation

## Haemotox<sup>®</sup> rFC

Artikel Nr.: 31310

Lagerung: +2-8°C

Nur für Forschungs- und Laborzwecke  
Nicht für diagnostische Verwendung



# Inhaltsverzeichnis

## 1 Allgemeine Informationen

- 1.1. Verwendungszweck
- 1.2. Testprinzip
- 1.3. Spezifikationen
- 1.4. Kit Inhalt

## 2 Sicherheitsinformationen

## 3 Vermeidung von Kontaminationen

## 4 Instrumentierung und Software

## 5 Vorbereitung der Reagenzien

- 5.1. Verwendung der Kitkomponenten, Stabilität und Lagerungsbedingungen
- 5.2. Präparation der Reagenzien

## 6 Testprotokoll

- 6.1. Hinweise zur Testdurchführung
- 6.2. Standard Präparation
- 6.3. Probenvorbereitung
- 6.4. Spike Kontrolle
- 6.5. Testdurchführung
- 6.6. Analyse der Standardkurve mittels Linearer Regression
- 6.7. Analyse der Standardkurve mittels des Logistischen 4-Parameter Regressionsmodells
- 6.8. Typische Standardkurven
- 6.9. Störfaktoren und Grenzen des Verfahrens

## 7 Trouble Shooting

## 8 Zubehör zur Testdurchführung

## 9 Vertrieb und Technischer Service

## 10 Gesetzliche und Regulatorische Informationen

## 11 Revisionsverfolgung

### Abkürzungen

dRFU	Unterschied in relativen Fluoreszenzeinheiten zwischen Messpunkten einer Messung
net dRFU	Unterschied in relativen Fluoreszenzeinheiten zwischen Messpunkten einer Messung (Blank Korrektur)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EU	Endotoxin Einheiten (1 EU $\approx$ 0,1 ng LPS (FDA RSE <i>E. coli</i> O113 EC-6))
LAL	Limulus Amoebocyten Lysat
LPS	Lipopolysaccharide
MTP	Mikrotiterplatte
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSE	Referenz Standard Endotoxin

# 1 Allgemeine Informationen

## 1.1 Verwendungszweck

Haemotox<sup>®</sup> rFC wird für die quantitative *in vitro* Bestimmung von Lipopolysacchariden (LPS) in pharmazeutischen und biologischen Endprodukten, zur In-Prozess Kontrolle, für Forschungszwecke und zur Testung von Medizinprodukten eingesetzt.

Haemotox<sup>®</sup> rFC ist ein homogener, enzymatischer Test, der den LPS Rezeptor (rekombinanter Faktor C) der Blutgerinnungskaskade des Pfeilschwanzkrebses in Kombination mit einem Fluoreszenzsubstrat verwendet.

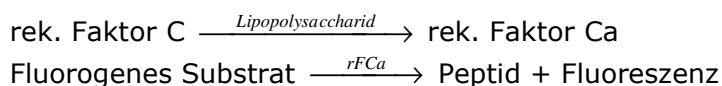
**Achtung:** Nur für Labor- und Forschungszwecke. Haemotox<sup>®</sup> rFC darf nicht für klinische Proben verwendet oder zur Diagnose von humanen oder tierischen Erkrankungen herangezogen werden.

## 1.2 Testprinzip

**Endotoxin** Endotoxine sind Bestandteile der Zellwände gram-negativer Bakterien. Diese werden durch das humane Immunsystem erkannt und führen zu ernsten, folgenschweren physiologischen Reaktionen. Der Hauptbestandteil der Endotoxine gram-negativer Bakterien ist das Lipopolysaccharid (LPS). Es besteht aus einem konservierten Teil (Lipid A + konservierter, fester Kohlenhydratanteil in der Core-Region) und einem hoch-variablen Teil (O-Antigen).

**Gerinnungskaskade des Limulus** In den Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses, den Amoebozyten, hat sich im Laufe der Evolution eine Gerinnungskaskade entwickelt, um Infektionen durch gram-negative Bakterien abzuwehren. Der Hauptrezeptor dieser proteolytischen Kaskade ist der Faktor C. Faktor C liegt als Zymogen (Vorläufer einer aktiven Protease) vor, das durch Endotoxin aktiviert wird.

**Faktor C** Rekombinanter Faktor C (rFC) wird anstelle des Lysates aus den Amoebozyten des Pfeilschwanzkrebses in Kombination mit einem synthetischen Fluoreszenzsubstrat eingesetzt.



## 1.3 Spezifikationen

Messbereich	0 bis 50 EU/ml
Nachweisgrenze	0,005 EU/ml, definiert durch die Konzentration des niedrigsten Standards
Testdauer	60 Minuten
Lagerung und Stabilität	Bei +2-8°C, ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Weitere Informationen zur Lagerung und Haltbarkeit der einzelnen Komponenten siehe Tabelle in Kapitel 5.
Validierung	Die Leistungsfähigkeit des Haemotox <sup>®</sup> rFC wurde durch Validierungsstudien bestätigt. Diese Daten sind auf Anfrage erhältlich.

## 1.4 Kit Inhalt

Komponente	Behältnis	Inhalt	Beschreibung
<b>1</b> Enzym	Plastikflasche, farblose Kappe	1 x 2,5 ml	Enzymlösung zur Detektion des LPS, 10-fach konzentriert
<b>2</b> Substrat	Braune Plastikflasche, braune Kappe	1 x 2,5 ml	Fluoreszenzsubstrat, 10-fach konzentriert
<b>3</b> Endotoxin Standard	Glasflasche, orange Kappe	2 Flaschen	Endotoxin Standard, lyophilisiert, enthält ca. 100 EU LPS von <i>E. coli</i> O55:B5
<b>4</b> Wasser (Endotoxin-frei)	Plastikflasche, blaue Kappe	2 x 100 ml	Endotoxin-freies Wasser zur Rekonstitution des Standards und zur Verdünnung von Standard und Proben
<b>5</b> Testpuffer	Braune Plastikflasche, braune Kappe	2 x 12 ml	Testpuffer, für das Testreagenz aus Substrat (2) und Enzym (1)
<b>6</b> Mikrotiterplatte	Plastikbeutel	2 Platten	Sterile, Endotoxin-freie Platten, 2 x 96 Vertiefungen

## 2 Sicherheitsinformationen

Alle Komponenten des Kits werden als nicht gefährlich eingestuft, wurden aber nicht auf ihre toxikologischen Eigenschaften untersucht. Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

## 3 Vermeidung von Kontaminationen

Endotoxin-freie Bedingungen	Alle Materialien, wie Behälter oder Pipettenspitzen müssen Endotoxin-frei sein. Zur Präparation von Proben- und Standardverdünnungen werden Glasröhrchen empfohlen, da Endotoxin eventuell an hydrophoben Plastikoberflächen anhaftet.
Behandlung von Glasmaterial	Nach dem Standardreinigungsverfahren sollte Glas bei 200°C für 4 Stunden oder bei 250°C für 1 Stunde "gebacken" werden. Öffnungen mit Aluminiumkappen oder Aluminiumfolie fest verschließen.
Behandlung von Plastikmaterial	Plastikmaterial kann mit 1 M NaOH für 6 – 12 Stunden behandelt werden. Danach mit großen Mengen Endotoxin-freiem Wasser spülen und an der Luft trocknen lassen. Das letzte Spülwasser muss einen neutralen pH Wert aufweisen.
Umgang mit Probenmaterial	Proben sollen gekühlt oder tiefgefroren gelagert werden. Probenmaterial sorgfältig behandeln, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Alle Materialien mit direktem Kontakt zu Proben oder Testreagenzien müssen Endotoxin-frei sein.

## 4 Instrumentierung und Software

Vortex	Standard- und Probenverdünnungen müssen kräftig gemischt werden. Hilfreich ist der Einsatz eines Multitube Vortexgerätes (z. B. Heidolph Multi Reax Reagenzglas-schüttler).														
Inkubator	Die Inkubation der Mikrotiterplatte sollte idealerweise im Plattenreader bei 37°C durchgeführt werden. Alternativ kann die Platte auch in einem Inkubator bei 37°C zwischen dem Messzeitpunkt Null und dem Messzeitpunkt 60 Minuten inkubiert werden.														
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreader	<p>Zur Messung des Haemotox<sup>®</sup> rFC können Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreader von verschiedenen Anbietern eingesetzt werden. Haemotox<sup>®</sup> rFC wurde mit dem FLx800<sup>™</sup> Fluoreszenzreader von BioTek Instruments entwickelt und validiert. Alle Validierungsdaten wurden mit diesem Gerät und den untenstehenden Settings erstellt. Bei Einsatz eines anderen Readers können diese Gerätesettings als Orientierung dienen, müssen dann aber validiert werden.</p> <p>Geräteeinstellungen:</p> <table><tr><td>Temperatur</td><td>37 °C</td></tr><tr><td>Anregungsfilter (nm/Bereich)</td><td>380/20</td></tr><tr><td>Emissionsfilter (nm/Bereich)</td><td>440/40</td></tr><tr><td>Ableseorientierung</td><td>von oben</td></tr><tr><td>Messungen pro Well</td><td>mind. 10</td></tr><tr><td>Schüttelmodus</td><td>an</td></tr><tr><td>Sensitivität/ PMT Gain</td><td>0,5 EU/ml: dRFU <math>\approx</math> 5% des Max.</td></tr></table> <p>(bei gewählter Standardgerade von z. B. 0,005 – 5.0 EU/ml)</p> <p>Hinweis: Schütteln für 15 Sekunden vor der ersten Ablesung, mittlere Schüttelgeschwindigkeit.</p>	Temperatur	37 °C	Anregungsfilter (nm/Bereich)	380/20	Emissionsfilter (nm/Bereich)	440/40	Ableseorientierung	von oben	Messungen pro Well	mind. 10	Schüttelmodus	an	Sensitivität/ PMT Gain	0,5 EU/ml: dRFU $\approx$ 5% des Max.
Temperatur	37 °C														
Anregungsfilter (nm/Bereich)	380/20														
Emissionsfilter (nm/Bereich)	440/40														
Ableseorientierung	von oben														
Messungen pro Well	mind. 10														
Schüttelmodus	an														
Sensitivität/ PMT Gain	0,5 EU/ml: dRFU $\approx$ 5% des Max.														
Einstellung der Gerätesensitivität (Gain)	<p>Bei der ersten Durchführung des Haemotox<sup>®</sup> rFC muss die Sensitivitätseinstellung (Gain) des Fluoreszenzreaders justiert werden. Die optimale Steigung der Standardkurve wird erreicht, wenn das Signal des 0,5 EU/ml Standards so justiert wird, dass es bei 5% des maximal detektierbaren Signals liegt. Zum Beispiel liegt der Bereich für den FLx800<sup>™</sup> Reader zwischen 0 und 99.999 RFU. Für dieses Gerät sollte der 0,5 EU/ml Standard so justiert werden, dass er bei dRFU <math>\approx</math> 5.000 RFU liegt.</p> <p>Achtung: Die Gain Settings müssen für jeden Reader individuell eingestellt und bei jedem Kit-Chargenwechsel überprüft werden.</p>														
Auswertesoftware	<p>Zur Erstellung der Standardkurve und zur Kalkulation der Endotoxinmenge in unbekanntem Proben benötigt man eine Auswertesoftware. Idealerweise werden die Daten des Haemotox<sup>®</sup> rFC mit der Funktion der linearen Regression ausgewertet (Logarithmus der Endotoxin Konzentration gegen Logarithmus net dRFU). Alternativ kann der dynamische Bereich bis 50 EU/ml vergrößert werden, indem mit der Funktion der nicht linearen Regression (Logistische 4-Parameter Funktion) ausgewertet wird.</p> <p>Bei Verwendung des Fluoreszenz-Readers von BioTek Instruments kann die Gen5<sup>™</sup> Software für die Kalkulation der Daten eingesetzt werden. Die Settings sind auf Anfrage bei Haemochrom Diagnostica erhältlich.</p>														

## 5 Vorbereitung der Reagenzien

### 5.1 Verwendung der Kitkomponenten, Stabilität und Lagerungsbedingungen

Reagenz	Präparation	Stabilität und Lagerungsbedingungen für die Arbeitslösungen
<b>1</b> Enzym	Zur Herstellung des Testreagenz	Bei Lagerung bei +2-8°C haltbar bis zum aufgedruckten Verfalldatum
<b>2</b> Substrat	Zur Herstellung des Testreagenz	Bei Lagerung bei +2-8°C haltbar bis zum aufgedruckten Verfalldatum
<b>3</b> Endotoxin Standard	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rekonstitutionsvolumen, siehe Etikett</li> <li>• lyophilisierten Standard mit aufgedruckter Menge Endotoxin-freiem Wasser (Flasche 4) lösen</li> <li>• mindestens 10 Minuten vortexen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bei Lagerung bei +2-8°C 4 Wochen haltbar</li> <li>• in Aliquots bei -20°C haltbar bis zum aufgedruckten Verfalldatum</li> <li>• Nur einmal einfrieren und auftauen</li> </ul>
<b>4</b> Wasser (Endotoxin-frei)	gebrauchsfertig	Bei Lagerung bei +2-8°C haltbar bis zum aufgedruckten Verfalldatum
<b>5</b> Testpuffer	Zur Herstellung des Testreagenz	Bei Lagerung bei +2-8°C haltbar bis zum aufgedruckten Verfalldatum

### 5.2 Präparation der Reagenzien

#### 5.2.1 Rekonstitution des LPS Standards

Volumen zur Rekonstitution des LPS Standards (Flasche 3) siehe Etikett.

Zur Rekonstitution entsprechendes Volumen Endotoxin-freies Wasser (Flasche 4) in Flasche 3 pipettieren. Flasche verschließen, 10 Minuten bei 1400 rpm vortexen.

**Wichtig:** Zur Vermeidung von Kontaminationen für jeden Pipettierschritt eine neue Pipettenspitze verwenden.

#### 5.2.2 Testreagenz

Testreagenz direkt vor Gebrauch frisch zubereiten. Testreagenz aus 8 Teilen Testpuffer (Flasche 5), 1 Teil Enzym (Flasche 1) und 1 Teil Substrat (Flasche 2) herstellen. (Benötigte Menge je nach Ansatzgröße, siehe untenstehende Tabelle). Sorgfältig mischen, aber nicht vortexen.

Anzahl der Reaktionen	Benötigtes Testreagenz [ml]	Testpuffer [ml]	Substrat [ml]	Enzym [ml]
16	2	1,6	0,2	0,2
32	4	3,2	0,4	0,4
48	6	4,8	0,6	0,6
64	8	6,4	0,8	0,8
80	10	8,0	1,0	1,0
96	12	9,6	1,2	1,2

## 6 Testprotokoll

### 6.1 Hinweise zur Testdurchführung

Allgemeine Hinweise

- Alle benötigten Reagenzien sind im Kit enthalten.
- Während des Gebrauchs Kontamination vermeiden.
- Vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) temperieren.
- Sorgfältig pipettieren, um auch kleine Volumina exakt zu pipettieren.
- Für jeden Testdurchgang eine Standardkurve erstellen.
- Alle Messungen in Doppelwerten durchführen.
- Reagenzien von unterschiedlichen Chargen dürfen nicht gemischt werden, sondern müssen in einer Testserie eingesetzt werden.

Benötigtes Zubehör:

- Pipetten
- Mehrkanalpipette oder Dispenser
- Pipettenspitzen, Endotoxin-frei
- Glasreagenzröhrchen, Endotoxin-frei (z. B. Haemotox® Sample Tubes)

Geräte:

- Vortexmischer, 0-1500 rpm
- Fluoreszenz-Mikrotiterplattenreader, temperierbar
- Inkubator 37°C (optional, wenn der Mikrotiterplattenreader nicht temperierbar ist)

### 6.2 Standard Präparation

Serielle Verdünnung des LPS Standards

- Der rekonstituierte LPS Standard hat eine Konzentration von 50 EU/ml.
- Zur Präparation der Verdünnungsreihe Endotoxin-freie Glasröhrchen verwenden.  
**Wichtig:** Verdünnung in Plastikgefäßen kann zu einer schlechten Wiederfindung bei niedrigen Konzentrationen führen.
- Zur Erstellung der Verdünnungsreihe werden 900 µl Endotoxin-freies Wasser in jedes Röhrchen pipettiert, ebenso für den Nullstandard (Blank).
- 100 µl des rekonstituierten LPS Standards werden für die Präparation des zweiten Standards hinzugefügt. Gefäß verschließen und für 1 Minute bei 1400 rpm vortexen (Konzentration 5 EU/ml).
- Wiederholen des 1:10 Verdünnungsschritts, um die weiteren Konzentrationen (Standards) herzustellen.
- Endotoxin-freies Wasser als Nullstandard (Blank) einsetzen.
- Die Standardverdünnungen sind bei +2-8°C für 8 Stunden stabil.

Standardkonzentrationen

Abhängig von der eingesetzten Auswertemethode werden verschiedene Standardkonzentrationen angesetzt:

Standard [EU/ml]	Nicht lineare Regression	Lineare Regression
50	+	-
5	+	+
0,5	+	+
0,05	+	+
0,005	+	+
0	+	+

### 6.3 Probenvorbereitung

#### Probenvorbereitung/Probenverdünnung

Wasserproben werden unverdünnt analysiert. Andere Matrixkomponenten können mit dem Test interferieren (siehe Kapitel 6.9). Aus diesem Grund ist das Testen auf Störfaktoren unerlässlich. Das Testen auf Störfaktoren (Inhibierung/Verstärkung) mit der Endpunktfluoreszenzmethode wird durch Spiken der Probe bzw. der verdünnten Probe mit einer bekannten Konzentration Endotoxin durchgeführt. Dazu untersucht man in Doppelwertbestimmung die Wiederfindung des Spikes, entsprechend den Herstellerangaben (Abschnitt 6.4). In den meisten Fällen ist die Wechselwirkung der Probenmatrix abhängig von der Konzentration der Matrixkomponenten, die sich vom LPS unterscheiden. Inhibierung/Verstärkung kann man deshalb größtenteils durch Verdünnung der Probe mit Endotoxin-freiem Wasser ausschalten. Für komplexe Proben muss eventuell eine weitergehende Probenvorbehandlung durchgeführt werden. Zur Probenverdünnung Endotoxin-freie Glasröhrchen verwenden.

Beispiel für den Ansatz einer 1:10 Verdünnung:

900 µl Endotoxin-freies Wasser (Flasche 4) in einem Glasröhrchen vorlegen und 100 µl Probe dazugeben. Vortexen.

### 6.4 Spike Kontrolle

Spiken der Probe	Das Spiken der Probe muss durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob Komponenten der Probe mit dem Test interferieren und ob eine Verdünnung durchgeführt werden muss (siehe Abschnitt 6.9 für Störfaktoren).
Spike Material	Der im Kit enthaltene Endotoxin Standard ist für die Spike Kontrolle zu verwenden.
Spike Konzentration	Der Spike ist aus dem mittleren Bereich der Standardkurve zu wählen, in Abhängigkeit von der Verdünnung und dem zu erwartenden Endotoxingehalt der Probe
Empfohlenes Testprotokoll	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vier Replikate der Probe messen, 4x100 µl in jede Vertiefung pipettieren.</li><li>• Zugabe von 10 µl 5 EU/ml oder 50 EU/ml Standard zu zwei Vertiefungen mit der Probe (0,5 EU/ml oder 5 EU/ml Spike in der Probe).</li><li>• Weiterverfahren wie in Kapitel 6.5 Testdurchführung beschrieben.</li></ul>
Validierungskriterien	Ein Ergebnis ist valide, wenn die Spikewiederfindung im Bereich von 50 bis 200 % liegt. Proben mit einer Spikewiederfindung außerhalb des gültigen Bereiches müssen entweder weiter verdünnt oder vorab einer zu bestimmenden Probenvorbehandlung unterzogen werden.



## 6.5 Testdurchführung

Reader Start	Der Fluoreszenz-Reader soll mind. 20 Minuten vorgewärmt werden, um 37°C zu erreichen.
Beschicken der Mikrotiterplatte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anzahl der benötigten Vertiefungen bestimmen. Es sind mindestens Doppelbestimmungen vorgeschrieben.</li> <li>• 100µl der Blanks, Standards und Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.</li> <li>• Spiken wie in Abschnitt 6.4 beschrieben durchführen.</li> <li>• Die befüllte Mikrotiterplatte auf 37°C vorinkubieren.</li> </ul>
Detektion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorbereitung von 100 µl Testreagenz pro verwendete Vertiefung (Abschnitt 5.2.2).</li> <li>• 100 µl des Testreagenzes in jede Vertiefung pipettieren. Idealerweise befindet sich die Mikrotiterplatte im Reader.</li> <li>• Reader schließen und eine Minute für Temperatenausgleich warten.</li> <li>• Fluoreszenzsignal für den Zeitpunkt Null ablesen (erstes Ablesen).</li> <li>• Inkubation der Platte bei 37°C (im Inkubator oder im Reader).</li> <li>• Fluoreszenzsignal nach 60 Minuten ablesen (zweites Ablesen).</li> </ul>

Empfehlung: Dispenser oder Mehrkanalpipette benutzen um die Pipettierzeit zu reduzieren.

Anmerkung: Längere Reaktionszeit erhöht die Sensitivität des Testes.

### Übersicht Testdurchführung

Start Fluoreszenz-Reader zum Temperieren auf 37°C		
Standard Rekonstitution und Verdünnung Abschnitt 5.2.1 und 6.2	Probenvorbereitung Abschnitt 6.3	Spike Kontrolle Vorbereitung Abschnitt 6.4
100 µl vorbereitete Standards, Proben und Kontrollen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren		
Temperieren der Mikrotiterplatte mit Standards, Proben und Kontrollen auf 37°C		
Herstellung des Testreagenzes Abschnitt 5.2.2		
100 µl des Testreagenzes in jede Vertiefung pipettieren		
Detektion		
Auswertung		

## 6.6 Analyse der Standardkurve mittels Linearer Regression

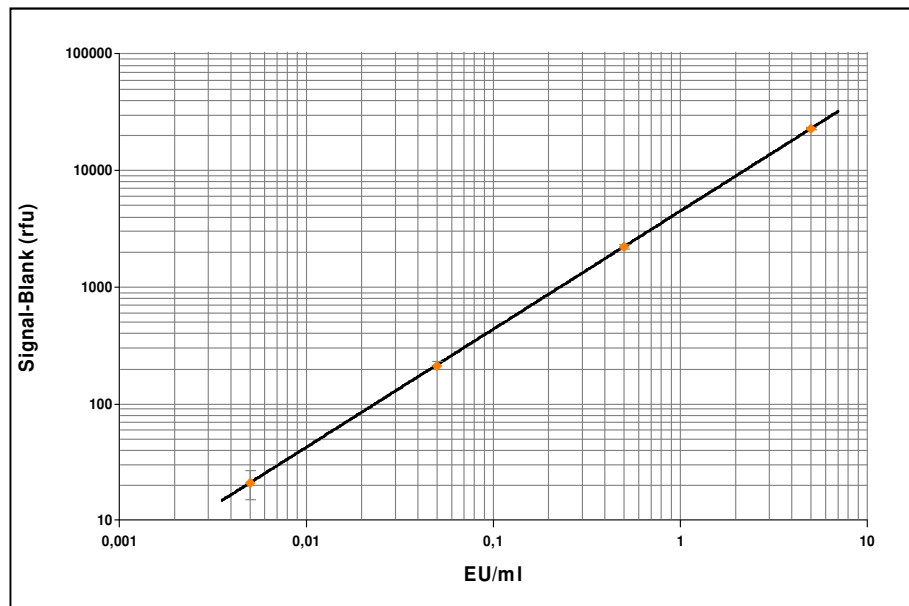
Null Korrektur	<ul style="list-style-type: none"><li>• Subtraktion der Daten des Nullpunkts von den Daten des Messpunkts 60 Minuten.</li><li>• Berechnung des Mittelwertes vom Nullstandard (Blank).</li><li>• Subtraktion des Mittelwertes der Blanks von den dRFU Werten der Standards und Proben (net dRFU).</li><li>• Berechnung des Logarithmus des Durchschnitts der net dRFU-Werte der Standards (<math>\emptyset</math> net dRFU) und der Konzentrationen [EU/ml].</li></ul>
Standardkurve	<ul style="list-style-type: none"><li>• Erstellen der Standardkurve: log [EU/ml] gegen log [net dRFU].</li><li>• Berechnung einer linearen Funktion mit folgender Gleichung: <math display="block">\text{Log}(Y) = A \cdot \text{log}(x) + B</math></li><li>• Berechnung des Regressionskoeffizienten (<math>R^2 \geq 0,980</math>).</li></ul>
Probenwerte	<ul style="list-style-type: none"><li>• Berechnung der Werte [EU/ml] auf der Basis der linearen Regressionsgeraden.</li><li>• Multiplizieren der Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor der Probe.</li></ul>
Spike Wiederfindung	<ul style="list-style-type: none"><li>• Berechnen der Spikewiederfindung als Differenz zwischen gespikter und ungespikter Probe. Das Ergebnis der Wiederfindung muss zwischen 50 - 200% liegen (z. B. zwischen 0,25 - 1,0 EU/ml bei einem 0,5 EU/ml Spike).</li></ul>

## 6.7 Analyse der Standardkurve mittels des Logistischen 4-Parameter Regressionsmodells (nicht-lineare Auswertung)

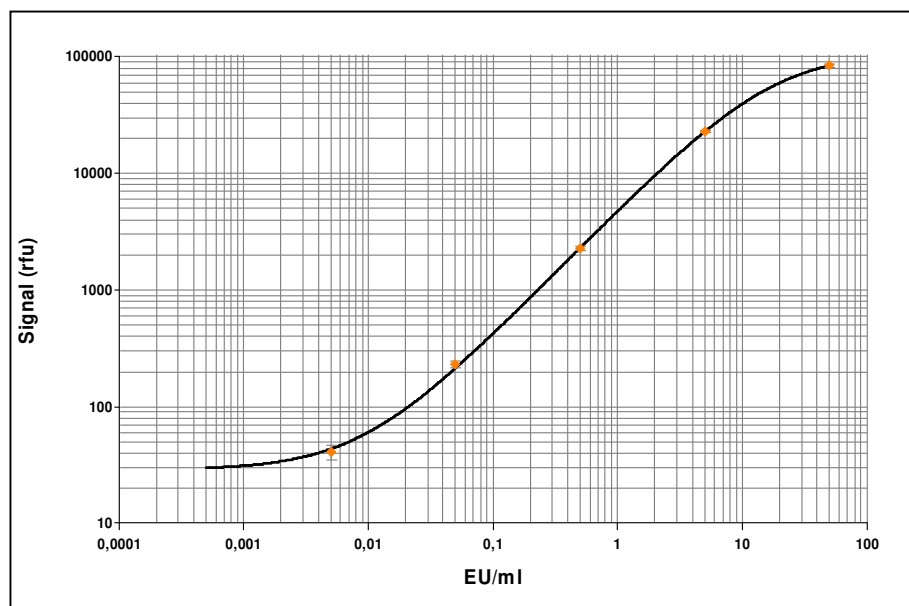
Rationale	<ul style="list-style-type: none"><li>• Der Anwendungsbereich kann bei Verwendung des 50 EU/ml Standards um eine Potenz erweitert werden. In diesem Fall wird empfohlen den Assay mit einem nicht-linearen Regressionsmodell auszuwerten.</li></ul>
Datenverarbeitung	<ul style="list-style-type: none"><li>• Messwert des Zeitpunkt t=0 min. vom Messwert t=60 min. subtrahieren (dRFU).</li><li>• Berechnung der Standardkurve entsprechend der folgenden Gleichung: <math display="block">Y = (A-D)/(1+(X/C)^{B+D})</math>mit angepasster Gewichtung 1/y</li><li>• Berechnung des Endotoxingehalts der Proben [EU/ml] mittels der nicht-linearen Funktion.</li><li>• Berechnung des Regressionskoeffizienten (<math>R^2 \geq 0,980</math>).</li></ul>
Spike Wiederfindung	<ul style="list-style-type: none"><li>• Berechnen der Spikewiederfindung als Differenz zwischen gespikter und ungespikter Probe. Das Ergebnis der Wiederfindung muss zwischen 50- 200% liegen (z. B. zwischen 0,25 - 1,0 EU/ml bei einem 0,5 EU/ml Spike).</li></ul>

## 6.8 Typische Standardkurven

1. Haemotox®  
rFC Standard-  
kurve:  
Lineare Regres-  
sion, erstellt mit  
der Gen5™ Soft-  
ware)



2. Haemotox®  
rFC Standard-  
kurve:  
4-Parameter lo-  
gistische nicht-li-  
neare Regression,  
erstellt mit der  
Gen5™ Software



## 6.9 Störfaktoren und Grenzen des Verfahrens

Eine Veränderung der Enzymreaktion durch störende Matrixkomponenten oder die Beeinflussung der Aggregatbildung des LPS, einschließlich der positiven Produktkontrolle, sind die häufigsten Gründe für eine ungültige Spikewiederfindung. Diese Interferenzen können oft einfach durch Verdünnung mit Endotoxin-freiem Wasser eliminiert werden, wobei die maximal erlaubte Verdünnung (MVD) nicht überschritten werden darf. Führt eine Messung an der maximal erlaubten Verdünnung nicht zum Ziel, so ist eine zusätzliche Probenvorbehandlung notwendig.

Im Folgenden sind einige potentielle Störfaktoren zusammengefasst:

Temperatur	Für die Durchführung der Detektionsreaktion ist eine Temperatur von 37°C zwingend notwendig. Vor Beginn der Testdurchführung müssen alle Testkomponenten auf Raumtemperatur gebracht werden.
Schütteln	Nach Zugabe des Testreagenzes muss die Mikrotiterplatte zur homogenen Durchmischung geschüttelt werden.
pH Wert	Proben mit extremen pH Werten können die Testdurchführung stören, wenn die Pufferkapazität des Testsystems nicht mehr ausreicht. Diese Wechselwirkungen können durch Spikeversuche festgestellt werden. Bei invalider Spikewiederfindung ist Verdünnung und/oder pH Einstellung auf pH 6-8 erforderlich.
Salzkonzentration	Eine Gesamtsalzkonzentration in der Probe sollte 500 mM nicht übersteigen. In Fällen höherer Konzentration ist Verdünnung erforderlich.
Detergenzien	Detergenzien können mit dem Haemotox® rFC Reagenz interferieren. Diese Beeinflussung kann durch Spikeexperimente untersucht werden. Bei invalider Spikewiederfindung ist eine weitere Verdünnung der Probe erforderlich.
Chelatbildner	Chelatbildner, wie EDTA, EGTA und Citrat in der Probe können mit dem Testreagenz interferieren. Bei Anwesenheit dieser Agenzien muss eine Verdünnung durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, diese Chelatbildner zu neutralisieren, z. B. durch Zugabe von Magnesium. Interferenzen können mit Spikeexperimenten untersucht werden.
Chaotropische Agenzien	Chaotropische Agenzien können mit dem Haemotox® rFC wechselwirken und z. B. zu einer Denaturierung des Faktor C führen. Bei invalider Spikewiederfindung ist eine stärkere Verdünnung erforderlich.
Organische Lösungsmittel	Organische Lösungsmittel können mit dem Haemotox® rFC wechselwirken und z. B. zu einer Denaturierung des Faktor C führen. Bei invalider Spikewiederfindung ist eine stärkere Verdünnung erforderlich.
Proteine	Proteine in hoher Konzentration können den Test stören. Diese Störungen sind von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine stark abhängig. Diese Wechselwirkungen werden durch Spike-Experimente detektiert.
Proteasen/ Peptidasen	Diese Proteine können eine falsch positive enzymatische Aktivität des Faktor C vortäuschen, indem sie eine schnelle Fluoreszenz Entwicklung entstehen lassen. Eine Denaturierung dieser Proteine, wie z. B. Trypsin, durch Hitze-Inaktivierung für 15 min. bei 75°C ist in solchen Fällen notwendig. Alternativ können auch Protease-hemmer eingesetzt werden.
Blutprodukte	Haemotox® rFC ist nicht für die Untersuchung von Endotoxin in Serum, Plasma oder Blutproben geeignet.

## 7 Trouble Shooting

Beobachtung	Mögliche Ursache	Maßnahmen
Kein Signal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Falsche Gerätesettings</li> <li>• Lampe defekt</li> <li>• Pipettierfehler</li> <li>• Inkubationstemperatur zu hoch oder zu tief</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Gerätesettings prüfen</li> <li>⇒ Lampe austauschen</li> <li>⇒ Reagenzien prüfen, Test wiederholen</li> <li>⇒ Temperatursettings prüfen</li> </ul>
Kein Signal mit einzelnen Proben	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipettierfehler (Standard bzw. Probe nicht pipetiert)</li> <li>• Störfaktoren</li> <li>• Ungeeigneter pH-Wert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Test wiederholen</li> <li>⇒ Spike Kontrolle, Verdünnung der Probe 1:10</li> <li>⇒ pH prüfen, Neutralisierung der Probe</li> </ul>
Niedriges Signal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Falsche Einstellung der Sensitivität (Gain)</li> <li>• Reader defekt, z. B. Optik</li> <li>• Inkubationstemperatur zu hoch/zu niedrig</li> <li>• Kit defekt (Transport oder Lagerung)</li> <li>• Kit oder Arbeitslösungen verfallen</li> <li>• Ungeeignete Emissionswellenlänge oder Bereich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Sensitivität einstellen</li> <li>⇒ Gerätecheck durchführen</li> <li>⇒ Temperatur prüfen</li> <li>⇒ Vorinkubation der Proben in der Platte bei 37°C auf 10 min. erhöhen</li> <li>⇒ Lagerungsbedingungen und Verpackung prüfen, Technischen Service kontaktieren</li> <li>⇒ Neuen Kit bzw. frische Reagenzien einsetzen</li> <li>⇒ Der Emissionsfilter sollte bei 440 nm, der Bereich bei 40 nm liegen</li> </ul>
Hohes Hintergrundsignal bei Standards und Negativer Kontrolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LPS Kontamination von Testkomponenten, z. B. Wasser</li> <li>• LPS Kontamination von Behältern oder Pipettenspitzen</li> <li>• Ungeeignete Anregungswellenlänge oder Bereich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Frische Reagenzien verwenden</li> <li>⇒ Andere Chargen der Behälter oder Pipettenspitzen verwenden, Glasgefäße einsetzen, Anbieter wechseln</li> <li>⇒ Der Anregungsfilter sollte bei 380 nm, der Bereich bei 20 nm liegen</li> </ul>
Hohe Well-zu-Well Variation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperaturgradient (Inkubator, Reader)</li> <li>• Pipette defekt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Inkubator/Reader prüfen bzw. wechseln</li> <li>⇒ Pipetten kalibrieren</li> </ul>
Invalide Spike Kontrolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Störfaktoren</li> <li>• Ungeeigneter pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Verdünnung der Probe</li> <li>⇒ pH prüfen, Probe neutralisieren</li> </ul>

## 8 Zubehör zur Testdurchführung

- **Haemotox® Sample Tubes**

Borosilikat-Glas Teströhrchen zur Verdünnung des Endotoxin Standards und zur Verdünnung und Aliquotierung von Endotoxinproben.

LPS-Gehalt:	< 0,001 EU/ml
Höhe	100 mm
Außendurchmesser	13 mm
Anzahl	50
<b>Artikel Nr.:</b>	<b>31331</b>

- **Haemotox® Sample Tubes**

Borosilikat-Glas Teströhrchen zur Verdünnung des Endotoxin Standards und zur Verdünnung und Aliquotierung von Endotoxinproben.

LPS-Gehalt:	< 0,001 EU/ml
Höhe	100 mm
Außendurchmesser	16 mm
Anzahl	10
<b>Artikel Nr.:</b>	<b>31333</b>

- **Haemotox® Sample Tubes mit Metalldeckel**

Borosilikat-Glas Teströhrchen mit Metalldeckel zur Verdünnung des Endotoxin Standards und zur Verdünnung und Aliquotierung von Endotoxinproben.

LPS-Gehalt:	< 0,001 EU/ml
Höhe	90 mm
Außendurchmesser	16 mm
Anzahl	70
<b>Artikel Nr.:</b>	<b>31336</b>

- **Haemotox® Water**

Steriles, hochgereinigtes pyrogenfreies Wasser zur Rekonstitution und Verdünnung von Reagenzien, Proben und Standards für die Endotoxinanalytik.

LPS-Gehalt: < 0,001 EU/ml.

Haemotox® Water 30 ml	20 x 30 ml
<b>Artikel Nr.:</b>	<b>31222</b>

Haemotox® Water 100 ml	16 x 100 ml
<b>Artikel. Nr.:</b>	<b>31223</b>

Haemotox® Water 500 ml	6 x 500 ml
<b>Artikel. Nr.:</b>	<b>31224</b>

- **Endotoxin-freie Probenbehälter**

Zertifiziert Endotoxin-freie Behälter zur Probenaufbewahrung.

30 ml, ohne Etikett, ca. 400 St.

<b>Artikel Nr.:</b>	<b>AB128</b>
---------------------	--------------

## 9 Vertrieb und Technischer Service

Für Bestellungen, weitere Informationen und technische Unterstützung wenden Sie sich an:

Haemochrom Diagnostica GmbH  
Renteilichtung 1  
DE-45134 Essen

Tel.: +49 201 843 77 0  
Fax: +49 201 53 64 56

E-Mail: info@haemochrom.de  
Internet: www.haemochrom.de

Haemochrom Diagnostica AB  
Skårs Led 3  
SE-412 63 Göteborg

Tel.: +46 31 706 2070  
Fax: +46 31 706 2080

E-Mail: info@haemochrom.se  
Internet: www.haemochrom.se

Richtlinien für die Durchführung der Testung auf bakterielle Endotoxine finden Sie in Kapitel 2.6.14 in Verbindung mit Kapitel 5.1.10 der Europäischen Pharmacopoeia und in Kapitel <85> der US Pharmacopoeia.

## 10 Regulatorische Informationen

**Handelsmarken** Haemotox<sup>®</sup> ist eine registrierte Handelsmarke von Haemochrom Diagnostica GmbH  
FLx<sup>™</sup> und Gen5<sup>™</sup> sind Handelsmarken von BioTek Instruments

## 11 Revisionsverfolgung

Datum	Kapitel	Änderung
<b>Revision 01_09 2019</b>		
Sept. 2019	4	Vortex: Zeitliche Vorgabe entfernt
Sept. 2019	4	Einstellung der Gerätesensitivität (Gain): Gain Settings nach Kit-Chargenwechsel überprüfen.
Sept. 2019	6.3	Vortexen der Probenvorverdünnung: Zeitliche Vorgabe entfernt
Sept. 2019	8	Aktualisierung verfügbarer Verbrauchsmaterialien

## Haemochrom Diagnostica GmbH

Germany, Austria,  
Switzerland, BeNeLux

Renteilichtung 1  
DE-45134 Essen

Tel.: +49 (0)201 843 770  
Fax: +49 (0)201 53 64 56

E-mail: [info@haemochrom.de](mailto:info@haemochrom.de)  
Internet: [www.haemochrom.de](http://www.haemochrom.de)

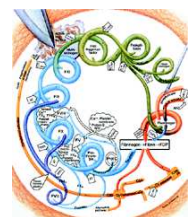
## Haemochrom Diagnostica AB

Sweden, Denmark,  
Finland, Norway

Skårs Led 3  
SE-412 63 Göteborg

Tel.: +46 (0)31 706 2070  
Fax: +46 (0)31 706 2080

E-mail: [info@haemochrom.se](mailto:info@haemochrom.se)  
Internet: [www.haemochrom.se](http://www.haemochrom.se)



Haemochrom  
Diagnostica