

ЛАЛ-реактив PYROSTAR™ ES-F

Флакон на несколько определений (2.0 мл и 5.2 мл)

Назначение: Limulus amoebocyte lysate (LAL) предназначен для определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. PYROSTAR™ ES-F предназначен для качественного определения эндотоксинов методом гель-тромб тест или количественного определения кинетическим турбидиметрическим методом. Диапазон количественного определения в кинетическом турбидиметрическом анализе (КТА) основан на чувствительности лизата в гель-тромб тесте, указанной на этикетке флакона, и представлен в таблице ниже:

Чувствительность лизата в гель-тромб тесте, указанная на этикетке (ЕЭ/мл)	Диапазон определения в КТА (ЕЭ/мл)
0.015	от 0.001 до 10
от 0.03 до 0.25	от 0.01 до 10

Общая информация

Эндотоксины (липополисахариды или ЛПС) – это компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Так как попадание эндотоксинов в кровоток через инъекцию или имплантацию может вызывать лихорадку и/или шок, определение бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах и изделиях медицинского назначения является критическим.

ЛАЛ-тест – это наиболее чувствительный метод определения бактериальных эндотоксинов, в настоящее время одобренный фармакопеей США (2). Первым методологическим подходом, который использовался для определения результатов анализа, было формирование геля на дне стеклянной реакционной пробирки. Также было замечено, что испытуемый раствор становится мутным перед формированием геля. Время, которое необходимо для образования определенного уровня помутнения обратно пропорционально количеству эндотоксинов в образце (1).

Для измерения скорости изменения мутности используется фотометр, такой как Toxinometer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Данная процедура количественного измерения обычно известна как Кинетический Турбидиметрический Анализ (КТА).

Используя эти свойства, Wako Chemicals USA разработали ЛАЛ-реактив, который может быть использован как для количественного турбидиметрического анализа, так и для качественного гель-тромб теста.

В статье «Бактериальные эндотоксины» USP приведены стандартные процедуры для валидации перед рутинным использованием.

Однако, специфичность ЛАЛ-реактива не абсолютна (7). Было показано, что ЛАЛ-реактив реагирует не только с эндотоксинами, но также и с β -1,3-глюканами. Несмотря на то, что ферментативный каскад, активируемый β -1,3-глюканами, является отличным от такого, активируемого эндотоксинами (8), конечный результат - образование геля - не различается.

Активация ЛАЛ-реактива глюканами в образце может быть предотвращена путем добавления большого количества карбоксиметилированного курдлана (КМК) к ЛАЛ-реактиву. Присутствие большого количества глюканов не мешает определению эндотоксинов. Wako впервые использовали данное открытие, разработав эндотоксин-специфичный буфер, который содержит высокие концентрации КМК. Когда для разведения ЛАЛ-реактива используется эндотоксин-специфичный буфер, ЛАЛ-реактив становится эндотоксин-специфичным. PYROSTAR™ ES-F – это новый состав ЛАЛ-реактива, в котором

карбоксиметилкурдлан лиофилизирован с лизатом. При разведении реактива PYROSTAR™ ES-F флакона на несколько определений водой для ЛАЛ-теста получается эндотоксин-специфичный ЛАЛ-реактив.

История и биологические принципы

Начало определения бактериальных эндотоксинов in-vitro было положено Левином и Бангом (3). Их наблюдения показали, что кровь мечехвостов, *Limulus Polyphemus*, сворачивается в присутствии грамотрицательных бактерий. Позже они установили, что все компоненты, которые необходимы для формирования геля, могут быть изолированы из циркулирующих амебоцитов, обнаруженных в крови *Limulus* (3,4).

В 1987 (5) году Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (U.S. Food and Drug Administration, FDA) выпустило Руководство для производителей лекарственных препаратов, биологических продуктов, ветеринарных препаратов и изделий медицинского назначения, в котором оно информировало о процедурах, которые оно считает необходимыми для валидации использования ЛАЛ-теста в качестве теста конечных продуктов на бактериальные эндотоксины. В 2000 году Руководство FDA было скомбинировано с фармакопейной статьей USP «Бактериальные эндотоксины», что сделало метод, описанный в USP, стандартным методом для производителей в США. В 2011 году Руководство FDA 1987 года было отозвано.

Предупреждения и общие предосторожности

PYROSTAR™ ES-F предназначен для определения in-vitro бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий. При обращении с ЛАЛ-реактивом следует соблюдать осторожность, так как его токсичность неизвестна.

Данный тест не является диагностическим приспособлением и не предназначен для определения уровня эндотоксинов у человека с целью диагностики.

Реактивы, входящие в поставку

ЛАЛ-реактив PYROSTAR™ ES-F: PYROSTAR™ ES-F – это лиофилизированный реактив, содержащий лизат амебоцитов *Limulus*, буфер, карбоксиметилкурдлан, одно- и двухвалентные катионы.

Приготовление: Постучите флаконом о ровную поверхность для того, чтобы убедиться, что весь порошок собрался на дне флакона. Осторожно удалите пробку и добавьте во флакон 2 мл или 5,2 мл воды для ЛАЛ-теста. Закройте флакон пробкой и аккуратно покачайте флакон круговыми движениями, чтобы растворить содержимое, избегая контакта раствора с пробкой.

Хранение: Храните реактив при температуре от 2 до 10°C. Разведенный реактив следует хранить в холодильнике при температуре 2-8°C максимально в течение 4-х часов или при температуре -15±5°C максимально в течение 14 дней. Разведенный ЛАЛ-реактив может быть заморожен и разморожен только один раз.

Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ): лиофилизированный реактив, который содержит очищенный эндотоксин из *E. Coli* и используется для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива, валидации метода для препарата и приготовления контролей ингибирования.

Приготовление: Погасите вакуум, осторожно приподняв и удалив резиновую пробку с флакона. Во флаконе содержится 500 нг эндотоксина. Каждая серия Контрольного Стандарта Эндотоксина тестируется в сравнении с Международным Стандартом Эндотоксина FDA (Reference Endotoxin Standard), при этом определяется активность контрольного стандарта в ЕЭ/нг. Значение содержания единиц эндотоксина (ЕЭ) во флаконе указано на этикетке флакона. Рассчитайте объем воды для ЛАЛ-теста, который необходимо добавить во флакон с КСЭ, чтобы получить раствор с концентрацией 1000 ЕЭ/мл. Добавьте во флакон рассчитанный объем воды для ЛАЛ-теста. Закройте флакон пробкой, переверните несколько раз и интенсивно перемешайте на вортексе в течение двух минут.

Хранение: Растворенный КСЭ можно хранить в холодильнике при температуре 2-10°C в течение одного месяца. КСЭ не должен храниться при температуре ниже 0°C. Перед использованием раствор следует интенсивно перемешать на вортексе в течение одной минуты.

Материалы и оборудование, не входящие в поставку

Международный стандарт эндотоксина (RSE): Международный стандарт эндотоксина USP, который имеет определенную активность 10 000 USP Единиц эндотоксина (EU).

Вода для ЛАЛ-теста (BET): вода, не содержащая эндотоксинов.

Наконечники, свободные от эндотоксинов

Пробирки для разведения, не содержащие эндотоксинов

Метод с использованием прибора Toxinometer

Фотометр Toxinometer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd)

Пробирки для реакции, свободные от эндотоксинов, с алюминиевыми крышками, для фотометра Toxinometer

Метод гель-тромб тест

Водяная баня или термоблок, способные поддерживать температуру $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Пробирки для реакции, свободные от эндотоксинов, с алюминиевыми крышками

Подготовка разведений контрольного стандарта эндотоксина

Приготовление контрольного стандарта эндотоксина

Основываясь на информации, представленной в Сертификате анализа, подготовьте раствор КСЭ с концентрацией 1000 ЕЭ/мл, как указано выше. Перемешайте раствор КСЭ с концентрацией 1000 ЕЭ/мл на вортексе при комнатной температуре. Используя раствор КСЭ с концентрацией 1000 ЕЭ/мл, приготовьте серию разведений эндотоксина, как показано в Таблице 1 или 2.

Перемешивайте каждую пробирку в течение 30 секунд между разведениями. Можно приготовить разведения других объемов, соблюдая то же соотношение объемов растворов.

Таблица 1

Схема разведений эндотоксина

(серия двукратных разведений)

Таблица 2

Схема разведений эндотоксина

(серия десятикратных разведений)

Исходная концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)	Объемы растворов КСЭ и воды для ЛАЛ-теста (мл)	Конечная концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)		Исходная концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)	Объемы растворов КСЭ и воды для ЛАЛ-теста (мл)	Конечная концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)

1000	0.4+3.6	100		1000	0.4+3.6	100
100	0.4+3.6	10		100	0.4+3.6	10
10	0.4+3.6	1		10	0.4+3.6	1
1	2.0+2.0	0.5		1	0.4+3.6	0.1
0.5	2.0+2.0	0.25		0.1	0.4+3.6	0.01
0.25	2.0+2.0	0.125		0.01	0.4+3.6	0.001
0.125	2.0+2.0	0.06				
0.06	2.0+2.0	0.03				
0.03	2.0+2.0	0.015				
0.015	2.0+2.0	0.008				
0.008	2.0+2.0	0.0039				

Отбор и подготовка образцов

Реакция с ЛАЛ-реактивом чувствительна к значению pH, которое для смеси ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата должно быть в диапазоне 6.0 – 8.0. PYROSTAR™ ES-F содержит буфер, который в большинстве случаев помогает доведению значения pH до необходимого диапазона. Если доведение pH необходимо, следует использовать апиrogenные растворы HCl или NaOH для доведения pH испытуемого образца.

Факторы, мешающие реакции

Перед тем, как использовать ЛАЛ-тест в рутинном контроле качества выпускаемого препарата, необходимо валидировать отсутствие факторов, мешающих проведению реакции, с помощью проведения анализа на мешающие факторы для каждого препарата. Считается, что препарат не содержит мешающих факторов, если при добавлении к образцу известного количества эндотоксина будет определено от 50 до 200% от добавленного количества эндотоксина.

Кинетический турбидиметрический анализ (КТА): подготовьте стандартную кривую, которая покрывает диапазон исследуемых концентраций. Добавьте в положительный контроль препарата количество эндотоксина, равное или близкое середине калибровочной кривой. Считается, что препарат не ингибирует реакцию, если определенное в опыте значение эндотоксина составляет от 50 до 200% от добавленной концентрации эндотоксина. Например, если стандартная кривая охватывает диапазон от 0,1 до 10 ЕЭ/мл, в препарат должен быть добавлен эндотоксин в такой концентрации, чтобы конечное значение составляло 1,0 ЕЭ/мл. Приемлемое определенное значение эндотоксина составит от 0,5 до 2,0 ЕЭ/мл.

Гель-тромб тест: Готовят две независимых серии разведений КСЭ, используя испытуемый препарат и воду для ЛАЛ-теста, соответственно. Анализируют серию разведений КСЭ, приготовленную на воде для ЛАЛ-теста (в двух повторностях) и серию разведений КСЭ, приготовленную на растворе испытуемого препарата (в четырех повторностях). Среднее геометрическое значение, определенное для каждой серии разведений, должно отличаться не более, чем в два раза от указанной на этикетке чувствительности.

Процедура кинетического турбидиметрического анализа

Кинетический турбидиметрический анализ (КТА) может быть проведен на приборе Toxinometer и с помощью программного обеспечения (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Кроме испытуемого препарата, достоверный анализ также должен включать стандартную калибровочную кривую для данного диапазона концентраций, положительный контроль препарата и отрицательный контроль. Все значения в анализе должны быть определены как минимум в двух повторностях.

Метод с использованием фотометра Toxinometer: Асептически перенесите 0,1 мл реактива PYROSTAR™ ES-F в пробирки для прибора Toxinometer, свободные от эндотоксинов. Добавьте 0,1 мл каждого образца или контроля в соответствующие пробирки, начиная с отрицательного контроля и заканчивая самой высокой концентрацией эндотоксина. После каждого добавления каждого препарата или контроля быстро перемешайте содержимое пробирки, избегая пенообразования. Поместите пробирку в прибор Toxinometer в порядке, соответствующем назначению пробирки. В конце периода инкубирования программное обеспечение Toxinometer выполнит анализ регрессии стандартной калибровочной кривой и рассчитает уровень содержания эндотоксинов в каждом образце.

Смотрите статью “Bacterial Endotoxins Test” в Американской Фармакопее и обратитесь к разделам, описывающим стандартную кривую и приготовление растворов (6).

Расчет концентрации эндотоксина

Во время кинетического турбидиметрического анализа мутность испытуемых растворов постоянно мониторируется прибором. Измеряется время, необходимое для достижения заданного уровня абсорбции раствора испытуемого образца. Это время определяется программой как Tg.

Программа производит log (ось x)/ log (ось y) корреляцию значения Tg по каждому стандарту с его соответствующей концентрацией эндотоксина. Пример серии стандартов и значения определенной в опыте концентрации эндотоксина в положительном контроле препарата (добавленная концентрация эндотоксина составляет 1,0 ЕЭ/мл) представлена ниже:

Данные анализа:

Стандарты	КСЭ (ЕЭ/мл)	Tg(мин)	Log Концентрации	Log Tg (мин)	
NC	0	NR	-----	-----	
STD1	10	8.0	1.000	0.903	

STD2	1	13.2	0.000	1.121	
STD3	0.1	23.6	-1.000	1.373	
slope			-0.2349		
y-intercept			1.132		
coefficient of correlation			-0.999		
		Tg (мин)	Log Tg (мин)	Рассчитанное значение ЕЭ/мл	% Recovery
Препарат 1	NPC1	NR	-----	-----	-----
	PPC1	13.6	1.134	0.987	98.7%
Препарат 2	NPC2	NR	-----	-----	-----
	PPC2	13.0	1.114	1.196	119.6%

NR= Не прореагировал

В данном примере положительный контроль препарата (PPC) для каждого испытуемого препарата уложился в допустимые пределы, что показывает, что в препаратах нет заметного усиления или ингибирования реакции. В испытуемом препарате (NPC) и в отрицательном контроле (NC) содержание эндотоксинов оказалось значительно ниже, чем концентрация эндотоксина в самом низком стандарте.

Критерии анализа:

Должна быть подтверждена линейность стандартной кривой в диапазоне концентраций эндотоксина, используемых для определения содержания уровня эндотоксинов. Должен быть проведен анализ стандартной кривой, состоящий как минимум из трех концентраций эндотоксина, охватывающих желаемый диапазон, а также из отрицательного контроля (вода для ЛАЛ-теста). Данный анализ проводится как минимум в трех повторностях. Следует обратиться к критериям достоверности для стандартной кривой в USP. Абсолютное значение коэффициента корреляции должно быть более или равно значению 0,980 (6).

Гель-тромб тест:

Для того, чтобы убедиться в точности и достоверности результатов с реактивом PYROSTAR™ ES-F, необходимо подтвердить чувствительность реактива, указанную на этикетке, как описано в статье «Бактериальные эндотоксины» <85> USP (6).

Каждый анализ должен включать отрицательный контроль, положительный контроль (содержащий 2λ), положительный контроль препарата (содержащий испытуемый препарат и эндотоксин в концентрации 2λ) и испытуемый препарат, где λ – чувствительность ЛАЛ-реактива PYROSTAR™ ES-F.

1. Добавьте 0,1 мл растворенного реактива PYROSTAR™ ES-F в каждую пробирку для реакции.
2. Асептически перенесите 0,1 мл каждого образца препарата или контроля в каждую пробирку, начиная с отрицательного контроля и заканчивая самой высокой концентрацией эндотоксина.
3. Быстро перемешайте содержимое пробирок и инкубируйте их при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в термоблоке или водяной бане в течение $60 \text{ минут} \pm 2 \text{ минуты}$.
4. После инкубирования осмотрите пробирки на предмет образования геля. В гель-тромб тесте каждая пробирка оценивается как положительный или отрицательный результат. Положительным результатом считается образование плотного геля, который не стекает при переворачивании пробирки на 180° . Отрицательный результат характеризуется отсутствием геля или формированием вязких масс, которые не удерживаются при переворачивании пробирки.
5. Результаты анализа считаются достоверными, если положительные результаты получены для пробирок с положительным контролем и положительным контролем испытуемого препарата, отрицательные результаты получены для пробирок с отрицательным контролем.

Анализ серии разведений эндотоксина:

Чувствительность, указанная на этикетке реактива PYROSTAR™ ES-F может быть подтверждена путем приготовления серии двукратных разведений международного стандарта эндотоксина или КСЭ (с подтвержденной активностью), перекрывающих заявленную чувствительность. Серия разведений должна быть проверена в четырех повторностях и включать отрицательный контроль. Чувствительность определяется путем расчета среднего геометрического значения для конечных точек, полученных для каждой повторности. Ниже описан пример расчета среднего геометрического для реактива PYROSTAR™ ES-F с чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл (λ):

Результаты, полученные в анализе:

Повторности	Разведения эндотоксина (ЕЭ/мл)					Конечная точка	Log ₁₀ Конечной точки
	0,25	0,125	0,06	0,03	Отрицательный контроль		
1	+	+	+	-	-	0,06	-1.222
2	+	+	-	-	-	0,125	-0.903
3	+	+	-	-	-	0,125	-0.903
4	+	+	+	-	-	0,06	-1.222

Следует перевести в десятичный логарифм значение концентрации эндотоксина в конечной точке для каждой повторности. Далее рассчитывается среднее значение логарифмов концентраций, и чувствительность реактива PYROSTAR™ ES-F определяется как антилогарифм среднего значения

логарифмов концентраций. В данном примере среднее значение логарифмов равно -1,063, и среднее геометрическое значение (antilog_{10}) равно 0,087.

Определение эндотоксинов в неизвестном образце методом гель-тромб тест

Для того, чтобы определить концентрацию эндотоксинов в неизвестном растворе, следует провести анализ двукратных разведений препарата и определить конечную точку реакции. Далее следует рассчитать среднее геометрическое фактора разведения и умножить его на чувствительность ЛАЛ-реактива.

Разведения препарата	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Фактор разведения	2	4	8	16	32	64
Повторность 1	+	+	+	-	-	-
Повторность 2	+	+	+	+	-	-
Фактор разведения конечной точки реакции			Log ₁₀ Конечной точки			
8			0.903			
16			1.201			
Среднее значение			1.054			
Antilog ₁₀			11.3			

$$\text{Концентрация эндотоксина} = 0.125 \text{ ЕЭ/мл} \times 11.3 = 1.4 \text{ ЕЭ/мл}$$

Литература

1. Cooper, J.F., Levin, J., and Wagner, H.N. "Quantitative Comparison of in Vitro and In Vivo Methods for Detection of Endotoxin" J. Lab, Clin, Med., 78, p.128 (1971).
2. Hochstein, H.D. "The LAL Test versus the Rabbit Pyrogen Test for Endotoxin Detection; Update '87." Pharm. Technol., 11(6), p. 124 (1987).
3. Levin, J. and Bang, F.B. "Clottable protein in *Limulus*: Its Localization and Kinetics of its Coagulation by Endotoxin." Thromb. Dieth. Haemonti., 19, p. 186 (1966).
4. Tai, J.Y. and Llu. T.Y. "Studies on Limulus Lysate, Isolation of Pro-clotting Enzyme." J. Biol, Chem., 252, p.2176 (1977).
5. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test of Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices. U.S. Dept. of Health & Human Services, FDA, December 1987.

6. "Bacterial Endotoxins Test." The United States Pharmacopeia, most current version. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
7. Cooper, J.F., Weary, M.E., and Jordon, J.T. "The Impact of Nonendotoxin LAL-Reactive Materials on *Limulus* Amebocyte Lysate Analysis." L. Parent, Sci \$ Tech, 51(1), (1966).
8. Tsuchiya, M., Oishi, H., Takaoka, A., Fusamoto, M. and Matsuura, S. "Discrimination between endotoxin and (1 – 3) beta-D-glucan using turbidimetric kinetic assay with *Limulus* amebocyte lysate." Chem Pharm Bull (Tokyo), 38(9). p. 2523 (1990).

Произведено:

Wako Chemicals USA, Inc.

LAL Division

1600 Bellwood Road

Richmond, VA 23237

License No. 1762



Тел: +7 499 682 61 09

E-mail: mail@algimed.ru