

Инструкция по использованию реактива PYROTELL®-T

Краткое описание метода испытаний

Limulus амебоцит лизат представляет собой водный экстракт клеток крови (amebocytes) краба меченосца *Limulus polyphemus*. В присутствии эндотоксина происходит помутнение LAL-реактива и при определенных условиях формируется гелевый сгусток. ЛАЛ-тест при помощи турбидиметрического метода проводится путем добавления заданного объема реактива Pyrotell-T к заданному объему тестируемого образца и инкубировании полученной смеси при температуре 37°C. Чем выше концентрация эндотоксина, тем быстрее будет происходить помутнение образца. Степень помутнения может быть использована для определения концентрации эндотоксина двумя способами.

В кинетическом турбидиметрическом методе проведения ЛАЛ-теста измеряется скорость изменения степени помутнения, либо время за которое достигается определенный уровень помутнения (так называемое onset time). Чем выше концентрация эндотоксина, тем меньше onset time. ЛАЛ-теста при помощи этого метода проводится с использованием специального оборудования, позволяющего инкубировать одновременно несколько образцов при температуре 37°C и одновременно измерять оптическую плотность через регулярные интервалы. Стандартные кривые строятся по значениям логарифма от значений onset time измеренных для стандартных концентраций эндотоксина на одной оси и значениям логарифма от значений стандартных концентраций эндотоксина по другой оси. Построенные стандартные кривые используются затем для определения концентраций эндотоксина в тестируемых образцах.

Турбидиметрический метод проведения ЛАЛ-теста являются быстрым, конкретно направленным, легко выполнимыми, и очень чувствительным. Предел чувствительности зависит от способа проведения исследования и используемого оборудования и может обнаруживать эндотоксины в концентрации до 0,001 единиц (EU) на мл.

Реактив

Реактив Pyrotell®-T упакован в 5 мл флакон в лиофилизированной форме. В нем содержится водный экстракт амбеоцитов *Limulus polyphemus*, стабилизатор, соль, и другие необходимые ионы. Никаких консервантов или буферов реактив не содержит.

Чувствительность реактива Pyrotell®-T не помечена на этикетке. Чувствительность определяется в конкретном тесте (обозначается через λ) как самая низкая концентрация эндотоксинов, используемая для построения стандартной кривой. Максимальная чувствительность, λ , реактива Pyrotell®-T составляет 0,001 EU / мл при использовании автоматических систем тестирования эндотоксинов Pyros Kinetix или LAL-5000, разработанных компанией Associates of Cape Cod. Реактив Pyrotell®-T предназначен только для использования в in-vitro диагностике. Он не предназначен для диагностики эндотоксемии в организме человека. Токсичность реактива Pyrotell®-T не была определена. Тем не менее, длительный или многократный контакт LAL лизата с кожей приводил к аллергической реакции I типа у некоторых людей (15). Таким образом, следует соблюдать осторожность при обращении с реактивом Pyrotell®-T.

Процедура разведения

1. Слегка постучите по флакону с реактивом Pyrotell®-T чтобы вещество оказалось на дне. Откройте крышку. Не загрязните отверстие флакона. Не используйте крышку повторно и не добавляйте воду во флакон через крышку. Небольшое количество реактива остающееся на крышке не повлияет на результат.
2. Разведите реактив Pyrotell®-T водой для ЛАЛ-теста (поставляется компанией Associates of Cape Code) или буфером (поставляются компанией Associates of Cape Code - приобретается отдельно). Не растворяйте реактив заранее — делайте это непосредственно перед использованием. Добавьте 5 мл воды или буфера как указано на этикетке флакона. Процесс растворения займет несколько минут, таким образом, добавляйте воду по крайней мере, за 5 минут до использования. Перемешайте жидкость во флаконе круговыми движениями для того чтобы обеспечить однородность, но избегайте интенсивной тряски, которая может привести к образованию пены и потери

чувствительности. Закройте флакон пленкой Parafilm M® и держите его в холодильнике при температуре 2-8°C, пока реактив не используется.

Условия хранения

Лиофилизированный реактив Pyrotell®-T является относительно стабильным и, при правильном хранении, сохранит полную активность даже по истечении срока годности, указанного на этикетке. Хранить реактив необходимо при температуре от -20°C до +8°C. Хранение при температуре ниже -20°C может привести к деформации крышки и нарушению герметичности и тем самым порчи реактива. Температура выше 37°C может привести к быстрой порче лиофилизированного реактива Pyrotell®-T, что будет выражаться в потере чувствительности и пожелтении вещества.

Разведенный реактив Pyrotell®-T, как правило прозрачный и слегка опалесцирующий, но некоторые серии реактива могут иметь небольшую мутность. Наличие небольших волокон или нитей не указывает на загрязнение и не влияет на активность, однако, хлопья или осадок, а также желтый цвет означает что реактив испорчен и не должен использоваться.

Разведенный реактив Pyrotell®-T является менее стабильным, чем лиофилизированный продукт. В разведенном виде реактив может храниться до 24 часов при температуре 2-8°C. Разведенный реактив Pyrotell®-T может быть заморожен один раз. Замороженный реактив будет сохранять чувствительность в течение 3-х месяцев при хранении при температуре ниже -20°C. После оттаивания необходимо провести визуальную проверку разведенного реактива, как и при первоначальном разведении.

Сбор и подготовка образцов

Образцы должны быть собраны в контейнеры, которые не содержат определяемых эндотоксинов. Рекомендуется использовать стеклянную апиrogenную посуду или одноразовые стерильные контейнеры из полистирола или полиэтилентерефталата (PET) чтобы свести к минимуму абсорбцию эндотоксина на поверхности контейнера. Не все пластиковые контейнеры свободны от определяемых эндотоксинов. Кроме того, вещества, выделяющиеся из некоторых пластиков, могут повлиять на результаты теста. Все используемые в тесте пробирки и контейнеры должны проверяться путем выборки случайным образом из партии некоторых единиц, спаласкивании их ЛАЛ-водой и выдержке при комнатной температуре в течение часа и тестировании этой воды на апиrogenность. Слитая из контейнеров вода должна содержать значительно меньше эндотоксинов чем минимальная стандартная концентрация эндотоксина, которая будет использоваться в тесте. Кроме того, слитая вода не должна ни увеличивать, ни уменьшать уровень эндотоксинов в тестируемых образцах, что определяется путем получения в качестве результата известного количества добавленного изначально эндотоксина.

pH реакционной смеси (раствор тестируемого образца смешивают с разведенным реактивом Pyrotell®-T в соотношении 4:1 или в другом соотношении если это определено протоколом проведения теста) должен быть в пределах от 6 до 8. Скорректировать значение pH образца можно при помощи HCl, NaOH, или буфера (которые свободны обнаруживаемых эндотоксинов). Нужно развести концентрированную HCl или NaOH ЛАЛ-водой до требуемой концентрации и добавить к тестируемому образцу такой объем, который не приведет к слишком сильному разбавлению тестированию образца. Если в результате корректировки pH тестируемого образца образуется осадок, необходимо увеличить разведение тестируемого образца перед корректировкой pH, однако необходимо следить за тем чтобы итоговый уровень разведения не превысил максимально допустимый (maximum valid dillution) – см.разел «Ограничения процедуры». Альтернативно можно развести реактив Pyrotell®-T совместимым буфером (поставляется компанией Associates of Cape Cod) и проверить уровень pH реакционной смеси. Не корректируйте pH незабуферизованных солевых растворов (saline) или воды. Обратите внимание, что разведение может помочь преодолеть проблемы с pH.

Вещества, денатурирующие протеины, формируют хелаты с ионами, связывают эндотоксины или изменяют гидрофобность эндотоксинов могут помешать получению корректных результатов при проведении теста. Мешающий фактор может быть обнаружен если обнаруживается значительно больше или меньше эндотоксинов, чем ожидаемое значение, когда заранее известное количество стандартной концентрации эндотоксинов добавляется к тестируемому образцу (см. "Ограничения процедуры"). В большинстве случаев, разведение образца поможет снизить концентрацию и

активность мешающих веществ и при этом позволит получить достоверный результат теста. Рекомендованные контрольные процедуры и схемы разведений описаны в разделе "Процедура проведения теста".

Образцы должны быть протестированы сразу же после подготовки. Если тестируемые нестерильные образцы должны предварительно храниться или пересылаться, то рекомендуется их предварительно заморозить. Образцы, которые должны содержать низкие концентрации эндотоксинов (меньше 1 EU/ml) необходимо проверять на снижение концентрации эндотоксинов во время хранения.

Процедура проведение теста

Реагенты

1. *Реактив Pyrotell®-T* (см. описание в разделах **Реактив** и **Процедура разведения** выше).
2. *LAL вода (LRW)* – *поставляется отдельно от реактива*. Рекомендуется использовать ЛАЛ воду производства компании Associates of Cape Cod, Inc (вода поставляется в различных объемах и видах упаковки). USP стерильная воды для инъекций без бактериостат или USP вода для орошений может использоваться только при условии, что доказано, что данная вода может быть использована в качестве ЛАЛ воды. Предельная концентрация эндотоксинов для обычной стерильной воды для инъекций USP составляет 0,25 EU/мл. Таким образом, обычная стерильная вода для инъекций может содержать обнаруживаемые эндотоксины, что делает ее непригодной для использования для проведения ЛАЛ-теста.
Чтобы подтвердить, что вода может использоваться в качестве ЛАЛ воды, необходимо протестировать ее в качестве образца, с положительным контролем (см. пункт 1.с. в разделе "Контроль"). Необходимо использовать только сертифицированную ЛАЛ-воду для разведения стандартов и подготовки положительных контролей (см. пункты 1а и 1.б. в разделе "Контроль").
Постройте стандартную кривую по результатам измерений для стандартных концентраций эндотоксинов. Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,980 (абсолютное значение). Концентрация эндотоксинов в тестируемой воде может быть оценена путем экстраполяции стандартной кривой ниже самой низкой стандартной концентрации эндотоксинов и должна быть значительно меньше этой минимальной стандартной концентрации. Кроме того, концентрация эндотоксинов при проведении положительного контроля должна быть в пределах 50% - 200%, от уровня использованной стандартной концентрации.
3. *Буфер* — *поставляется отдельно от реактива, заказывается по необходимости*. Для разведения реактива *Pyrotell®-T* для преодоления проблемы с pH или влиянием глюканов можно использовать буфер *Pyrosol®* (каталожный номер BC051 или BC554) или *Glucashield®* (каталожный номер GB051)
4. *Контрольный стандарт эндотоксина (CSE)* — *поставляется отдельно*. CSE, поставляемый компанией Associates of Cape Cod, используется для построения стандартных кривых, валидирования и контроля ингибирования. Каждый флакон содержит известное количество эндотоксинов. Каждый флакон CSE содержит эндотоксин, активность которого была определена в соотношении со стандартом эндотоксина США. Данная активность указана в сертификате анализа. USP стандарт эндотоксина (идентичный стандарту RSE) может быть получен от U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.
Примечание: Необходимо иметь ввиду что в сертификате анализа указывается активность конкретной серии CSE при тестировании с конкретной серией реактива Pyrotell®-T. Конкретная серия CSE может показывать различную активность при тестировании с различными сериями реактивов. Также различные серии CSE, скорее всего, покажут разную активность при тестировании с одной серией реактива. Необходимо определить активность CSE из сертификата анализа. Разводить и хранить CSE необходимо в соответствии с инструкциями производителя.

Материалы и оборудование

(поставляется отдельно)

1. *Пробирки для тестирования*. Выбор пробирок зависит от используемого для измерения оптической плотности оборудования. Для тестирования при помощи инкубационного пробирочного ридера, Pyros Kinetix® Flex необходимы апирогенные пробирки 8x75 мм из боросиликатного стекла. (пробирки, поставляемые Associates of Cape Cod, Inc имеют

каталожный номер ТК100). Для тестирования при помощи ридера LAL 5000 необходимы апиогенные пробирки 10x75 мм из боросиликатного стекла. (пробирки, поставляемые Associates of Cape Cod, Inc имеют каталожный номер TB050). Если тестирование производится при помощи ридера для микропланшет, то мы рекомендуем использование микропланшет Pyroplates®, которые сертифицированы на отсутствие эндотоксинов и глюканов. При использовании микропланшет других производителей необходимо помнить о том что некоторые материалы, из которых изготавливаются пластиковые микропланшеты, могут абсорбировать эндотоксины или давать другие помехи при проведении ЛАЛ-теста.

2. *Оптический ридер.* Для кинетического турбидиметрического метод рекомендуется использовать инкубационные ридеры, Pyros Kinetix® Flex, LAL 5000 или Биотек® ELx808™ поставляемые компанией ACC.
3. Держатель (штативы) для пробирок
4. Пипетки и микропипетки с наконечниками (рекомендуется использовать многоканальные пипетки при использовании микропланшет) или пипетки репитеры с пластиковыми шприцами наполнителями. Рекомендуется использовать одноразовые наконечники свободные от эндотоксинов и глюканов для предотвращения мешающих факторов. Associates of Cape Cod, Inc предлагает линейку продуктов Pyroclear®, которые сертифицированы на чистоту от эндотоксинов и глюканов.
5. *Вортекс-миксер*
6. *Пленка Parafilm M® (American National Can™).* Сторона, которой пленка соприкасается с бумагой как правило является свободной от эндотоксинов.
7. *Пробирки для разведений,* должны быть чистыми от эндотоксинов и иметь достаточный объем для разведения стандартного эндотоксина или образцов. См. раздел "Сбор и подготовка образцов".
8. *Печь для обработки горячим воздухом* достаточной мощности для нагрева, по крайней мере до 250°C для депирогенизации емкостей из стекла. Необходимо чтобы предмет подвергающийся депирогенизации находился в печи при температуре 250°C в течение минимум 30 минут. (3,12)

Контрольные процедуры

Контрольные процедуры необходимы для обеспечения достоверности результатов теста. Рекомендованные контрольные процедуры описаны в FDA (1,2) и USP (3).

1. Контроль на эндотоксины

а. Стандартные серии эндотоксинов. Подготавливайте свежий набор разведений из растворенного контрольного стандарта эндотоксина для каждого теста. Не используйте заранее подготовленные и хранившиеся разведения, если вы только стабильность концентраций эндотоксинов при хранении не подтверждена. Делайте разведения в геометрической прогрессии, чтобы получить необходимый диапазон концентраций эндотоксинов. Для проверки работы реактива *Pyrotell®-T* необходима серия концентраций 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 и 0.03125 EU/мл. Самая низкая концентрация эндотоксинов в любой серии концентраций КСЭ является пределом обнаружения данного теста и обозначается λ. Для того чтобы получить требуемый диапазон стандартных концентраций КСЭ используйте как можно меньшее количество разведений, а также соответствующие объемы пипеток для максимальной точности.

б. Положительный контроль (используется одна стандартная концентрация КСЭ) должен присутствовать, если стандартные ряд концентраций КСЭ (см.а. выше) не подготавливается таким же образом, как и положительный контроль продукта (см. с. ниже). Концентрация эндотоксина 4λ является подходящей при построении стандартной кривой при помощи 4,5, 6 двукратных разведений стандарта эндотоксина (например, 4λ = 0.125 EU/мл в серии стандартных концентраций, приведенной в п.а выше). Если производится каждый раз разведение более чем в два раза, то концентрация эндотоксина при положительном контроле должны быть выбрана из середины стандартной кривой. Например, концентрация 0,1 EU/мл рекомендуется для положительного контроля, при использовании серии стандартных концентраций, состоящей из 0,001, 0,01, 0,1, и 1 EU/мл. Если тестирование стандартной серии концентраций эндотоксинов не проводится, положительный контроль должен быть включен чтобы убедиться, что для определения концентрации эндотоксинов можно использовать полученные ранее и заархивированные параметры стандартной кривой. См. руководство FDA (1) и Промежуточное Руководство (2) в разделе описывающем процедуру тестирования лекарств при помощи ЛАЛ теста для получения детальной информации.

с. Положительный контроль продукта является контролем реакций повышающих/понижающих

концентрацию эндотоксинов и проводится путем добавления к тестируемому образцу или его разбавлению стандартной концентрации эндотоксинов. Концентрация эндотоксинов добавляемая к тестируемому образцу должна быть такой же, как и при положительном контроле. См. раздел b. выше для выбора соответствующей концентрации эндотоксина для положительного контроля продукта. Добавленный эндотоксин часто называют "спайк" (spike).

2. Отрицательный контроль.

Отрицательный контроль с тестированием апиогенной воды должен быть включен в каждый тест.

Изготовление образцов - Определение требуемых разведений для проведения теста

Если для тестируемого вида образцов ранее был разработан протокол испытаний сделайте необходимый набор разведений и далее следуйте указаниям раздела "Проведение теста". Если же протокол не был разработан для тестируемого типа образцов, сделайте серию десятикратных разведений образца. Не превышайте максимально допустимый предел разбавления продукта более чем в 10 раз. (См.раздел "Ограничения процедуры" ниже, или руководство FDA (1) для разъяснений и расчета максимально допустимых разведений (Maximum Valid Dilutions - MVD) и минимальных действительных концентраций (Minimum Valid Concentrations - MVC). Подготовьте соответствующие разведения всех образцов с положительным контролем продукта для каждого из них.

Проведение теста

Для получения удовлетворительных результатов теста необходимо следовать последовательной методике тестирования. Все контрольные стандартные концентрации и образцы должны быть протестированы по крайней мере дважды.

1. Подготовьте оборудование в соответствии с тем как этого требует проведение теста. В автоматизированной системе этот этап обычно включает в себя ввод описаний образцов, ввод параметров испытаний.
2. Добавьте в реакционные пробирки (микропланшеты) соответствующие объемы тестируемых образцов (образцы для отрицательного контроля, образцы с КСЭ, образцы тестируемого продукта и образцы для положительного контроля продукта). Для получения соотношения 1:1 в Pyros Kinetix возьмите тестируемый образец в объеме 0.1 мл, для получения соотношения 1:4 в Pyros Kinetix используйте объем 0.2 или 0.4 мл; в системе LAL 5000 объем образца должен быть 0.4 мл, а в микропланшетном ридере с инкубированием – 0.1 мл.
3. Добавьте реактив Pyrotell®-T в необходимом количестве в зависимости от процедуры.
 - a. Для методов с использованием индивидуальных реакционных пробирок критически важным является точное измерение времени реакции. Добавляйте реактив в каждую пробирку по очереди встряхивая пробирку в течение 2-х секунд и сразу же помещая ее в инкубационный пробирочный ридер. Добавляемый объем реактива Pyrotell®-T должен быть следующим: 0.1 мл для системы LAL 5000, а также для микропланшетных ридеров, и при использовании соотношения 1:1 в Pyros Kinetix и для большинства остальных систем. Если в Pyros Kinetix используется соотношение 1:4, то для образца в объеме 0.4 мл нужно добавлять 0.1 мл реактива, а для образца в объеме 0.2 мл – 0.05 мл реактива. Неправильное смешивание является одной из частых причин неудовлетворительных результатов теста. Наиболее удобно добавлять реактив используя автоматический дозатор. Для каждого забора реактива из флакона рекомендуется использовать новый наконечник. Для других тестовых протоколов могут браться другие объемы реактива.
 - b. В случае использования микропланшетного ридера добавьте реактив ко всем образцам в как можно более короткий промежуток времени, встряхивайте микропланшеты в течение от 5 до 30 секунд и поместите их в инкубатор ридера.
4. Как только инкубация началась не трогайте реакционные пробирки. Поверхность на которой располагается инкубатор (ридер) также должна быть защищена от вибрации.

5. Получение данных.

При тестировании кинетическим методом, необходимо выждать достаточно времени для того чтобы образцы с наименьшей концентрацией эндотоксинов достигли заданной оптической плотности. Автоматизированные системы тестов, как правило, прекратят тест по истечении заданного периода времени.

Результаты

1. Предварительные расчеты.

Определите время, необходимое для достижения образцами пороговой оптической плотности (обычно 0,02 единиц ОП в пробирочном ридере и 0,03-0,1 единиц ОП в микропланшетном ридере) после того, как были внесены какие-либо поправки в данные. Измерения оптической плотности должны проводиться относительно первоначального измерения оптической плотности принимаемого за ноль единиц ОП. Многие ридеры имеют программное обеспечение, которое выполняет эти расчеты. Время, необходимое для достижения пороговой ОП называют *onset time*.

2. Построение стандартной кривой.

Стандартная кривая строится путем регрессии *log onset time* для *log* стандартных концентраций КСЭ (Это обычно выполняется используемым программным обеспечением). Уравнение для линии регрессии описывает стандартную кривую.

3. Вычисление концентрации эндотоксина.

Рассчитайте концентрацию эндотоксинов для всех образцов (в том числе стандартных концентраций и контролей), используя уравнение прямой $y = ax + b$ представленное как $X = (Y - b)/a$

где:

$Y = \log \text{onset time}$ (для кинетического метода), или оптическая плотность (для метода конечной точки)

X : Кинетический метод: $X = \log$ концентрации эндотоксинов (для определения концентрации эндотоксинов нужно определить $\text{antilog } X$)

Метод конечной точки: $X =$ концентрация эндотоксинов

a = наклон линии

b = точка пересечения с осью Y

Умножьте полученную концентрацию эндотоксинов рассчитанную по стандартной кривой на степень разведения образца, чтобы получить концентрацию эндотоксинов в неразбавленном образце.

Эти расчеты обычно выполняются программным обеспечением.

Интерпретация

1. Для того, чтобы тест считался действительным, концентрация эндотоксина отрицательного контроля (рассчитанная путем экстраполяции стандартной кривой) должна быть значительно меньше, чем самая низкая стандартная концентрация КСЭ в тесте.

2. Коэффициент корреляции для стандартной кривой в тесте должен иметь абсолютное значение, по крайней мере 0,980.

3. Средняя измеренная концентрация эндотоксинов для положительного контроля (для проверки возможности использования ранее полученных данных стандартной кривой) должна быть в пределах 25% от номинальной концентрации позитивного контроля. Таким образом, если концентрация эндотоксинов положительного контроля составляет 0,125 EU/мл, измеренная концентрация должна быть в пределах от 0,09375 до 0,15625 EU/мл.

4. Определите средний диапазон значений *onset time* для стандартной кривой. Например, если значения *onset time* для двух образцов с наибольшей стандартной концентрацией эндотоксина составляют 1079 и 1087 секунд, а для двух образцов с наименьшей стандартной концентрацией

эндотоксина – 1954 и 1968 секунд, то средний диапазон значений *onset time* составляет 1083 – 1961 секунд. Действительные значения концентраций эндотоксина могут быть рассчитаны только для образцов чье **среднее** значение *onset time* попадает в средний диапазон значений *onset time* стандартной кривой. К примеру, действительный результат может быть получен для образца значения *onset time* которого составляют 1949 и 1965 секунд (что дает среднее значение 1957 секунд) несмотря на то, что одно из значений лежит за пределами стандартного диапазона.

5. Для того, чтобы продемонстрировать, что образец не влияет существенно на ЛАЛ/эндотоксин реакцию, измеренная концентрация эндотоксина положительного контроля продукта должна быть в пределах от 50 до 200% от номинальной концентрации добавленного КСЭ "спайка". Прежде чем определить, попадает ли измеренная концентрация эндотоксинов спайка в эти пределы, необходимо вычесть концентрацию эндотоксина измеренную для образца без добавленного к нему КСЭ (unspiked sample). Например, для того чтобы считалось, что в тесте нет значительных мешающих факторов, измеренная концентрация эндотоксина для образца положительного контроля продукта с концентрацией КСЭ 0,125 EU/мл (за вычетом измеренной концентрации эндотоксинов, в случае определения их наличия, в образце без добавления КСЭ) должна быть в пределах 0.0625-0.25 EU/мл (50 до 200% от 0.125 EU/мл). Если, например, измеренная концентрация эндотоксинов в образце без добавления КСЭ (unspiked sample) составляет 0,028 EU/мл, а измеренная концентрация эндотоксинов в положительном контроле продукта составляет 0,163 EU/мл, концентрация эндотоксинов добавленного КСЭ (спайка) считается как 0,163 - 0,028 = 0,135 EU/мл. Это считается в пределах допустимости и с учетом выполнения других требований, результаты теста считаются действительными.

Ограничения теста

Действительность теста ограничена степенью ингибирования или повышения концентрации эндотоксинов в тестируемом образце при проведении тестирования. Если тест не может быть валидирован (1, 2, 3) при концентрации образца, которая превышает минимальную допустимую концентрацию (MVC), то проверка на эндотоксины с использованием LAL тест не может заменить тест USP на апирогенность. MVC рассчитывается следующим образом:

$$MVC = (\lambda) \times (\text{дозировка образца}) / (\text{допустимый уровень эндотоксинов})$$

где λ в EU/мл, дозировка образца в единицах на кг массы тела, а допустимый уровень эндотоксинов в EU/кг.

Максимальное допустимое разведение (MVD) является разведением образца при котором достигается минимально допустимая концентрация (MVC) (1). Оно рассчитывается путем деления исходной концентрации образца на минимально допустимую концентрацию. Допустимый уровень эндотоксинов составляет 0,2 EU/кг для лекарств предназначенных для введения в позвоночник и 5 EU/кг для всех остальных инъекционных лекарств. Допустимый уровень эндотоксинов для медицинских устройств выражается в EU на мл извлекаемого объема или на объем смывки, в соответствии с тем как это описано в руководстве FDA (1). Для устройств, имеющих контакт со спинномозговой жидкостью, лимит составляет 0,06 EU/мл, для тех устройств, которые не имеют такого контакта - 0,5 EU/мл. Предел для liquid devices такой же, как и для лекарств в соответствии с требованиями в руководства FDA (1).

Тестирование Трипсина даст ложноположительный результат, если только его не денатурировать перед тестированием температурной обработкой. Такие образцы как кровь, сыворотка, альбумин или плазма могут иметь мешающие проведению теста турбидиметрическим методом факторы.

Ожидаемые значения

Концентрацию эндотоксинов в тестируемых образцах можно оценить количественно если она попадает в диапазон от стандартных концентраций эндотоксина которые используются для построения стандартной кривой. Если приходится разбавлять образцы, чтобы преодолеть эффект понижения или повышения концентрации, минимальная концентрация эндотоксинов которую можно обнаружить в исходном (неразведенном) образце, увеличивается соответственно. Материалы, полученные из биологических источников, могут содержать измеримый уровень эндотоксинов даже после биохимической очистки. Вода, полученная путем дистилляции, обратного осмоса или ультрафильтрации или должна содержать меньше эндотоксина, чем

обнаруживаемый уровень, если процесс очистки работает правильно, и вода не заражается после производства.