



**Limulus Amebocyte Lysate (LAL)  
QCL-1000™**

## **ИНСТРУКЦИЯ к наборам реактивов QCL-1000™ для выполнения хромогенного теста по конечной точке**

## **Важно: Прочитайте всю брошюру перед выполнением анализа**

### **Назначение**

Данный реактив предназначен для определения содержания бактериальных эндотоксинов *in vitro* в лекарственных препаратах, вводимых парентерально и предназначенных для человека и животных, а также в биологических продуктах и изделиях медицинского назначения. Данный реактив не предназначен для определения содержания эндотоксинов в клинических образцах или для диагностики заболеваний человека. Данный тест проводится с использованием ЛАЛ-реактива и синтетического хромогенного субстрата для определения эндотоксинов хромогенным методом.

### **Фармакопея описывает следующие необходимые процедуры:**

1. Установление значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов для лекарственных препаратов и изделий медицинского назначения.
  2. Валидация использования ЛАЛ теста в качестве контроля готовой продукции на содержание бактериальных эндотоксинов.
  3. Разработка методики проведения рутинных анализов (8).
- Процедуры, описанные далее, основаны на указаниях Фармакопеи.

### **Предупреждение**

Использовать только для *in Vitro* диагностики. ЛАЛ-реактив QCL-1000 не предназначен для обнаружения эндотоксемии у человека. ЛАЛ тест может служить заменой анализу пирогенности, проводимому на кроликах, если он проводится в соответствии с указаниями Фармакопеи для проверки парентеральных лекарственных препаратов для человека и животных, а также биологических продуктов и изделий медицинского назначения (8).

### **Объяснение теста**

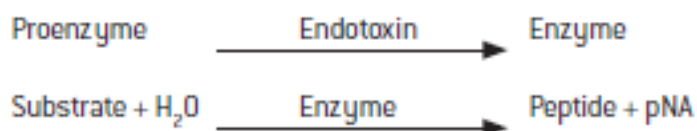
Хромогенный тест по конечной точке – это количественный метод определения содержания бактериальных эндотоксинов Грам-отрицательных бактерий. Испытуемый образец смешивают с ЛАЛ-реактивом, поставляемым в наборе, и инкубируют при температуре  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут. Затем к раствору ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата добавляют раствор хромогенного субстрата и инкубируют смесь при температуре  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  еще в течение 6 минут. Далее реакцию останавливают с помощью стоп-реагента. Если в растворе присутствует эндотоксин, то развивается желтое окрашивание. Фотометрически измеряют оптическую плотность испытуемого образца при длине волны 405-410 нм. Так как величина оптической плотности прямо пропорциональна содержанию эндотоксинов в образце, концентрацию эндотоксинов определяют при помощи стандартной калибровочной кривой.

Использование ЛАЛ теста для определения содержания эндотоксинов берет начало с наблюдений Банга (1), который обнаружил, что введение Грам-отрицательных бактерий в кровяное русло мечехвостов *Limulus Polyphemus* вызывает внутрисосудистое свертывание крови и гибель животного. Позднее Левин и Банг (2,3) показали, что это внутрисосудистое свертывание является результатом реакции между эндотоксинами и свертывающим ферментом, который присутствует в циркулирующих амебоцитах мечехвоста. После того, как был подобран соответствующий антикоагулянт для крови мечехвостов *Limulus*, Левин и Банг (4) приготовили лизат из очищенных амебоцитов, который оказался исключительно чувствительным индикатором присутствия эндотоксинов. Далее Солум (5,6) и Янг, Левин, и Прендергаст (7) выделили и очистили

свертывающий белок из лизата амебоцитов мечехвостов и показали, что реакция с эндотоксином является ферментативной.

В настоящем методе определения эндотоксинов используется изначальная часть реакции ЛАП-реактива с эндотоксином, в которой профермент под действием эндотоксинов превращается в свертывающий фермент, который в свою очередь действует на хромогенный субстрат и высвобождает из него хромофор р-нитроанилин (pNA), что приводит к развитию желтого окрашивания.

### Принципы реакции



Эндотоксины Грам-отрицательных бактерий катализируют превращение профермента в активный свертывающий фермент в ЛАП-реактиве (7). Начальная скорость этого превращения определяется концентрацией присутствующего эндотоксина. Активированный свертывающий фермент катализирует высвобождение pNA из бесцветного субстрата Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. Концентрация высвобожденного pNA измеряется фотометрически при длине волны 405-410 нм после того, как реакция будет остановлена стоп-реагентом. Корреляция между величиной оптической плотности и содержанием эндотоксинов в образце является линейной в диапазоне концентраций эндотоксина 0,1 – 1,0 ЕЭ/мл. Концентрация эндотоксина в образце рассчитывается, исходя из сравнения значений оптической плотности для испытуемого образца со значениями оптической плотности для известных концентраций эндотоксина в стандартной калибровочной кривой.

### Поставляемые реактивы и условия хранения

#### ЛАП-реактив (50-641W, 50-642E), флакон с желтой этикеткой

ЛАП-реактив содержит лиофилизированный лизат, полученный из циркулирующих амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus*.

Непосредственно перед использованием растворите содержимое флакона с помощью воды для ЛАП-теста в соответствии со следующей таблицей:

| Каталожный номер | Объем воды для ЛАП-теста, требуемый для разведения |
|------------------|--|
| 50-641W          | 1,4 мл на флакон                                   |
| 50-642E          | 3,0 мл на флакон                                   |

Если для анализа потребуется более одного флакона ЛАП-реактива, достаньте из коробки два или более флаконов. Аккуратно перемешайте флаконы, избегая пенообразования. Лиофилизированный ЛАП-реактив следует хранить при температуре +2–+8°C. Реактив не следует держать на свету длительное время.

Разведенный ЛАЛ-реактив должен быть немедленно использован. Разведенный лизат можно хранить при температуре - 10°C или ниже в течение одной недели, если замораживать его сразу же после разведения. Замораживать и размораживать ЛАЛ-реактив можно только один раз.

#### **Контрольный стандарт эндотоксина E. coli 0111:B4 (E50-640), флакон с красной этикеткой**

Каждый флакон содержит приблизительно 15-40 ЕЭ лиофилизированного эндотоксина. Разведите контрольный стандарт с помощью 1 мл воды для ЛАЛ-теста, нагретой до комнатной температуры. Фактическая концентрация эндотоксина во флаконе будет определяться значением, указанным с Сертификат анализа. Например, если в сертификате анализа указано значение 24 ЕЭ, то при растворении содержимого 1 мл воды для ЛАЛ-теста будет получена концентрация 24 ЕЭ/мл. Интенсивно перемешайте разведенный стандарт на вортексе не менее 15 минут. Сертификаты анализа доступны на сайте [www.lonza.com/coa](http://www.lonza.com/coa).

Лиофилизированный контрольный стандарт эндотоксина следует хранить при температуре +2—+8°C. Разведенный контрольный стандарт остается стабильным в течение 4-х недель при температуре +2—+8°C. Перед каждым последующим использованием следует доводить флакон со стандартом до комнатной температуры и интенсивно перемешивать 15 минут. Это является очень важным, так как молекулы эндотоксина могут приставать к стенкам флакона.

Для удобства пользователей к каждому ЛАЛ-реактиву поставляется соответствующий контрольный стандарт. Можно использовать и другие препараты стандартов эндотоксина, однако, значение их активности при использовании в хромогенном анализе должно быть установлено по национальному стандарту эндотоксина (RSE).

**Предупреждение:** содержит материалы человеческого происхождения.

#### **Хромогенный субстрат (S50-640), флакон с желтой этикеткой**

Каждый флакон содержит приблизительно 7 мг лиофилизированного субстрата. Разведите субстрат путем добавления 6,5 мл воды для ЛАЛ-теста для получения концентрации, приблизительно равной 2 мМ. Перед использованием раствор субстрата следует нагреть до 37°C ± 1,0°C.

Лиофилизированный хромогенный субстрат следует хранить при температуре +2—+8°C. После разведения раствор субстрата остается стабильным в течение четырех недель при температуре +2—+8°C. **Следует не допускать длительного хранения субстрата на свету.**

#### **Вода для ЛАЛ-теста (W50-640), флакон с желтой этикеткой**

Каждый флакон содержит 30 мл воды для ЛАЛ-теста и используется для разведения всех реактивов и для приготовления отрицательного контроля. Вода для ЛАЛ-теста является эквивалентом воды для теста на обнаружение бактериальных эндотоксинов (ВЕТ). Вода для ЛАЛ-теста должна храниться при температуре 2—8°C.

**Внимание:** вода для ЛАЛ-теста включена не во все упаковки.

#### **Материалы и оборудование, не включенные в поставку**

1. Для наборов, не содержащих воду, вода для ЛАЛ-теста #W50-640 (30 мл), #W50-100 (100 мл), #W50-500 (500 мл) или эквивалент.

2. Стоп-реагент (уксусная кислота, 25% раствор ледяной уксусной кислоты в воде; или раствор натрия додецилсульфата в воде, 10г/100 мл).
3. Натрия гидроксид, 0,1N, растворенный в воде для ЛАЛ-теста, для доведения значения рН.
4. Хлороводородная кислота, 0,1N, разведенная в воде для ЛАЛ-теста, для доведения значения рН.
5. Одноразовые апиrogenные стеклянные пробирки для разведения (13 × 100 мм, #N207 или аналог).
6. Серологические пипетки в индивидуальной упаковке.
7. Автоматические пипетки со стерильными наконечниками, индивидуально упакованными или в штативах (#25-415, #25-416, #25-417 или эквивалент).
8. **Для пробирочного метода** одноразовые апиrogenные стеклянные пробирки для анализа (10x75 мм, #N201, #N205 или эквивалент).
9. **Для микропланшетного метода** одноразовые стерильные планшеты.  
**Внимание:** перед использованием в рутинных анализах планшеты должны быть пре-квалифицированы (8).
10. Восьмиканальный дозатор.
11. Резервуары для реагентов (#00190035 или эквивалент).
12. Термоблок, нагревающий до температуры 37°C ± 1,0°C.
13. Таймер.
14. Вортекс.
15. Спектро- или фильтрфотометр, измеряющий при длине волны 405-410 нм, или микропланшетный ридер. Если используется неинкубирующий ридер, то требуется блок для нагревания пробирок. Микропланшетный адаптер для термоблока (#25-038).

## Отбор и подготовка образцов

Следует использовать технику асептической работы, чтобы избежать контаминации микроорганизмами или эндотоксинами. Все материалы, контактирующие с испытуемым образцом или с реактивами, не должны содержать эндотоксинов. Чистая стеклянная посуда и материалы могут считаться свободными от эндотоксинов после обработки в сухожаровом шкафу при температуре 250°C в течение 30 минут. Следует соблюдать соответствующие меры предосторожности, чтобы не допустить последующего загрязнения материалов эндотоксинами.

Исходя из опыта, большинство стерильных, индивидуально упакованных пластиковых пипеток и наконечников являются апиrogenными. Тем не менее, эти материалы должны быть проверены перед использованием в рутинных анализах.

Если необходимо довести рН испытуемого образца до значений 6,0-8,0, можно использовать апиrogenные растворы гидроксида натрия или соляной кислоты. Всегда следует измерять значение рН аликвоты испытуемых образцов, чтобы избежать контаминации испытуемого раствора рН-электродом. Не следует доводить значение рН у растворов, не обладающих буферной емкостью.

Образцы, подлежащие испытанию, должны храниться таким образом, чтобы вся бактериологическая активность в них останавливалась, в противном случае уровень эндотоксинов в них со временем может возрастать. Например, можно хранить образцы при температуре 2-8 °C в течение времени, не превышающего 24 часов, при хранении образцов более 24 часов образцы следует заморозить. Использование соответствующих контейнеров для сбора образцов, а также условия хранения образцов должны быть валидированы конечным пользователем.

Если контейнер с растворителем, используемым для разведения реактивов был предварительно вскрыт, или если растворитель для реактива был поставлен не Лонзой, то растворитель должен быть отдельно проверен на отсутствие содержания эндотоксинов.

### Подготовка реактивов

Перед использованием следует дать реактивам нагреться до комнатной температуры.

В каждой серии определения эндотоксинов используются четыре раствора стандарта эндотоксина. В таблице ниже приведена схема разведения для приготовления этих стандартов из контрольного стандарта эндотоксина, поставляемого в наборе. Могут быть использованы альтернативные схемы разведения стандартов так же, как и стандарты, не поставляемые в данном наборе. Первое разведение из исходного раствора стандарта эндотоксина должно быть сделано по формуле  $1/X$ , где  $X$  равно концентрации эндотоксина во флаконе. При этом будет получен раствор с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл. Например, если активность равна 23 ЕЭ/мл, то первое разведение будет  $1/23$  или 0,1 мл исходного раствора эндотоксина в 2,2 мл воды для ЛАЛ-теста.

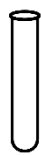
**Внимание:** для подготовки разведений КСЭ не рекомендуется использование пластиковых пробирок.

| Концентрация эндотоксина, ЕЭ/мл | Объем исходного раствора КСЭ | Объем раствора КСЭ с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл | Объем воды для ЛАЛ-теста |
|---------------------------------|------------------------------|--|--------------------------|
| 1,0                             | 0,1 мл                       | -  | $(X-1)/10$ мл            |
| 0,5                             | -                            | 0,5 мл                                       | 0,5 мл                   |
| 0,25                            | -                            | 0,5 мл                                       | 1,5 мл                   |
| 0,1                             | -                            | 0,1 мл                                       | 0,9 мл                   |

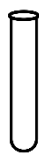
$X$  = концентрация эндотоксина во флаконе

Пробирки для приготовления серии разведений КСЭ подписывают следующим образом:

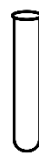
**1 ЕЭ/мл**



**0,5 ЕЭ/мл**



**0,25 ЕЭ/мл**

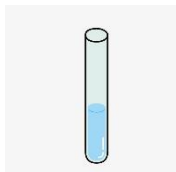


**0,1 ЕЭ/мл**

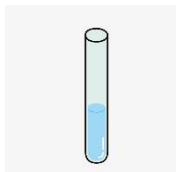


В пробирки вносят следующий объем воды для ЛАЛ-теста.

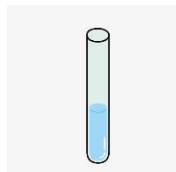
**$(X-1)/10$  мл**



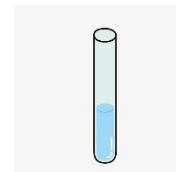
**0,5 мл**



**1,5 мл**



**0,9 мл**



1. Готовят раствор КСЭ с концентрацией 1 ЕЭ/мл. Для этого в соответствующий контейнер (пробирку) вносят 0,1 мл исходного раствора КСЭ и  $(X-1)/10$  мл воды

для ЛАЛ-теста, где X равен концентрации контрольного стандарта эндотоксина во флаконе. Подписывают данный контейнер как **1 ЕЭ/мл**. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты. Например, если X = 23 ЕЭ/мл, то 0,1 мл исходного раствора КСЭ смешивают с 2,2, (23-1)/10, воды для ЛАЛ-теста.

2. Переносят 0,5 мл раствора КСЭ с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл к 0,5 мл воды для ЛАЛ-теста в контейнер (пробирку), подписанный **0,5 ЕЭ/мл**. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.
3. Переносят 0,5 мл раствора КСЭ с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл к 1,5 мл воды для ЛАЛ-теста в контейнер (пробирку), подписанный **0,25 ЕЭ/мл**. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.
4. Переносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл к 0,9 мл воды для ЛАЛ-теста в контейнер (пробирку), подписанный **0,1 ЕЭ/мл**. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.

## Процедура анализа

Добавление всех реактивов в анализе должно быть последовательным. Для того, чтобы правильно определить концентрацию эндотоксинов, со всеми пробирками или лунками планшета следует обращаться одинаково. Это означает, что в серии испытаний реактивы должны вноситься в одном и том же порядке и с одной и той же скоростью от пробирки к пробирке или от лунки к лунке. В таблице ниже приведена процедура анализа:

|   | Образец | Бланк   |
|---|---------|---------|
| Испытуемый образец или стандарт при температуре 20-25°C | 50 мкл  | -       |
| Вода для ЛАЛ-теста                                      | -       | 50 мкл  |
| ЛАЛ-реактив   | 50 мкл  | 50 мкл  |
| Смешивание и инкубирование при 37°C ± 1,0°C             | 10 мин. | 10 мин. |
| Раствор субстрата при 37°C ± 1,0°C                      | 100 мкл | 100 мкл |
| Смешивание и инкубирование при 37°C ± 1,0°C             | 6 мин.  | 6 мин.  |
| Стоп-реагент  | 100 мкл | 100 мкл |
| Немедленное смешивание                                  | -       | -       |

## Пробирочный метод

1. Аккуратно внесите по 50 мкл испытуемого образца или стандарта в соответствующую апиrogenную пробирку для реакции, помещенную в термоблок или водяную баню при 37°C ± 1,0°C. Каждая серия определений должна включать отрицательный контроль (бланк) плюс четыре концентрации стандарта эндотоксина в двух повторностях. В пробирках с отрицательным контролем вместо испытуемого препарата содержится 50 мкл воды для ЛАЛ-теста. Все реагенты должны добавляться и инкубироваться в одно и то же время.
2. Во время, равное 0, добавьте в каждую пробирку по 50 мкл ЛАЛ-реактива. Начинайте отсчет времени с того момента, как ЛАЛ-реактив будет добавлен в

- первую пробирку. Важно быть последовательным в соблюдении порядка внесения реактива от пробирки к пробирке и скорости дозирования. Важно тщательно перемешать два раствора, но не перемешивать их на вортексе.
3. Во время анализа, равное 10 минутам, добавьте 100 мкл раствора субстрата (предварительно нагретого до  $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ). Вносите субстрат во все пробирки в том же порядке, как и в пункте 2. Сохраняйте одинаковую скорость дозирования. Тщательно перемешайте растворы.
  4. Во время анализа, равное 16 минутам, добавьте по 100 мкл стоп-реактента. Сохраняйте тот же порядок и ту же скорость дозирования, как в пунктах 2 и 3. Тщательно перемешайте.
  5. Используя дистиллированную воду, чтобы настроить фотометр на нулевое значение светопоглощения, измерьте оптическую плотность для каждой реакционной пробирки при длине волны 405-410 нм.

### Микропланшетный метод

1. Дайте планшету предварительно нагреться в термоблоке до  $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .  
**Внимание:** для проведения данного анализа не используйте термостат в виде шкафа.
2. Оставляя планшет в термоблоке при  $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ , аккуратно внесите по 50 мкл испытуемого образца или стандарта в соответствующую лунку планшета. Каждая серия определений должны включать отрицательный контроль (бланк) плюс четыре концентрации стандарта эндотоксина в двух повторностях. В пробирках с отрицательным контролем вместо испытуемого препарата содержится 50 мкл воды для ЛАЛ-теста. Все реагенты должны добавляться и инкубироваться в одно и то же время.
3. Во время, равное 0, добавьте 50 мкл ЛАЛ-реактива в первую лунку планшета или, если используется многоканальный дозатор и резервуар для реактивов, то в первую колонку. После добавления ЛАЛ-реактива начинайте отсчет времени. Важно быть последовательным в соблюдении порядка внесения реактива от лунки к лунке или от ряда к ряду и скорости дозирования. Как только ЛАЛ-реактив будет внесен во все лунки планшета, содержащие образцы или стандарты, быстро достаньте планшет из термоблока и несколько раз постучите по краям планшета, чтобы улучшить перемешивание. После этого верните планшет в термоблок и закройте его крышкой.
4. Во время анализа, равное 10 минутам, добавьте 100 мкл раствора субстрата (предварительно нагретого до  $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ). Вносите субстрат в том же порядке, как и в пункте 3. Сохраняйте одинаковую скорость дозирования. Как только раствор субстрата будет внесен во все лунки планшета, быстро достаньте планшет из термоблока и несколько раз постучите по краям планшета, чтобы улучшить перемешивание. После этого верните планшет в термоблок и закройте его крышкой.
5. Во время анализа, равное 16 минутам, добавьте по 100 мкл стоп-реактента. Сохраняйте тот же порядок и ту же скорость дозирования, как в пунктах 3 и 4. Как только стоп-реактент будет добавлен во все лунки планшета, достаньте планшет из термоблока и постучите несколько раз по краям планшета.
6. Измерьте оптическую плотность для каждой лунки планшета при длине волны 405-410 нм (если необходимо, используйте дистиллированную воду, чтобы настроить фотометр на нулевое значение светопоглощения).  
**Внимание:** для определенных микропланшетных ридеров оптимальные параметры считывания достигаются при объеме испытуемых образцов менее 300



мкл. Конечный объем реакционных смесей в лунках может быть уменьшен путем добавления только 50 мкл указанного выше стоп-реагента без ухудшения результатов теста.

## **Критерии анализа**

### **Линейность**

Для каждой новой серии реактивов должна быть проверена линейность стандартной калибровочной кривой в рамках диапазона концентраций, используемых для определения содержания эндотоксинов в образце (так называемая начальная квалификация). В этом анализе должно быть исследовано не менее 3 концентраций стандарта эндотоксина, охватывающих желаемый диапазон концентраций, а также отрицательный контроль с водой для ЛАЛ-теста. Все испытуемые растворы проверяются как минимум в трех повторностях. В стандартных условиях проведения реакции могут быть приготовлены стандарты эндотоксина в диапазоне от 0,1 до 1,0 ЕЭ/мл как описано в разделе «Подготовка реактивов».

Значение коэффициента корреляции ( $r$ ) для индивидуального значения разницы между оптической плотностью стандартов (как минимум 12 пунктов) и их относительной концентрацией эндотоксинов (см. Расчет концентрации эндотоксина, расчетный метод) должно быть  $\geq 0.980$ .

### **Воспроизводимость**

Следует убедиться в воспроизводимости и низком коэффициенте отклонения для повторностей. Коэффициент отклонения (C.V.) равен одной сотой стандартного отклонения группы значений, разделенного на среднее значение. Коэффициент отклонения выражается в процентах и должен быть менее 10%. Из практики – приемлемое значение C.V. составляет 3–4% при измерении нескорректированной оптической плотности для стандарта 1,0 ЕЭ во время анализа по начальной квалификации.

## **Расчет концентрации эндотоксина**

В стандартных условиях светопоглощение при 405-410 нм является линейным в ряду концентраций эндотоксина от 0,1 до 1,0 ЕЭ/мл (см. Критерии анализа). Существует несколько методов расчета концентрации эндотоксина в испытуемых образцах. Для того, чтобы рассчитать значение разницы светопоглощения, следует из значения светопоглощения для стандартов и для образца вычесть значение светопоглощения для отрицательного контроля.

### **А. Графический метод**

Поместите по оси Y значение оптической плотности для четырех стандартов эндотоксина, а по оси X – концентрацию эндотоксинов в ЕЭ/мл. Отложите точки, обозначающие значение оптической плотности для каждого стандарта эндотоксина. Проведите линию, наиболее точно соединяющую эти точки и определите графически концентрацию эндотоксинов в образце.

### **В. Расчетный или табличный метод**

Может быть использована таблица с линейной регрессией. Внесите значение разницы в величине светопоглощения и соответствующие значения концентраций четырех

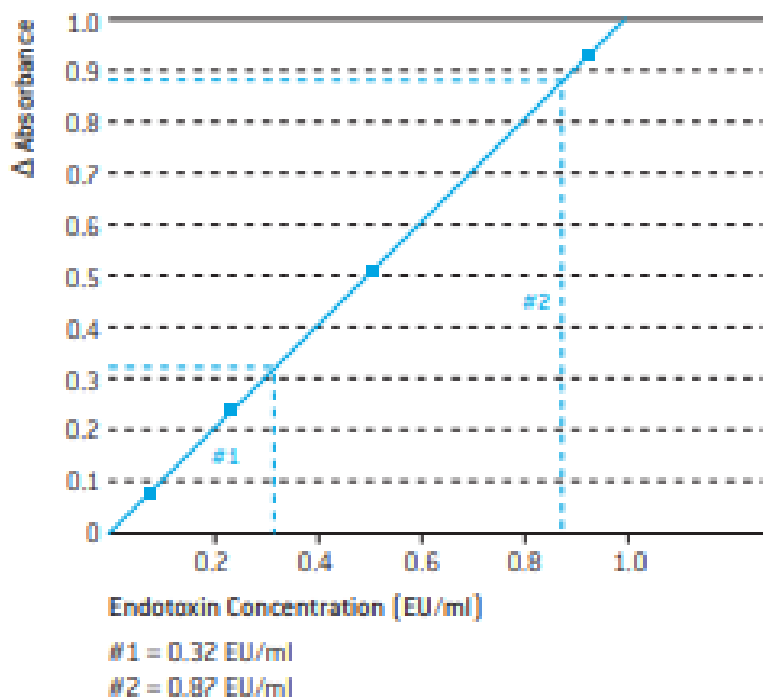
стандартов. Определите по линейной регрессии соответствующую концентрацию эндотоксина в образцах, исходя из значения светопоглощения для этих образцов.

### Пример данных

Example Data

| Tube Well | Sample        | Absorbance at 405 nm | Mean Absorbance | Mean $\Delta$ Absorbance |
|-----------|---------------|----------------------|-----------------|--------------------------|
| 1         | LAL Reagent   | 0.080                |                 |                          |
| 2         | Water (Blank) | 0.084                | 0.082           | —                        |
| 3         | 0.1 EU/ml     | 0.160                |                 |                          |
| 4         | Standard      | 0.180                | 0.170           | 0.088                    |
| 5         | 0.25 EU/ml    | 0.309                |                 |                          |
| 6         | Standard      | 0.325                | 0.317           | 0.235                    |
| 7         | 0.5 EU/ml     | 0.570                |                 |                          |
| 8         | Standard      | 0.557                | 0.564           | 0.482                    |
| 9         | 1.0 EU/ml     | 1.052                |                 |                          |
| 10        | Standard      | 1.012                | 1.032           | 0.950                    |
| 11        | Product #1    | 0.372                |                 |                          |
| 12        |               | 0.392                | 0.382           | 0.300                    |
| 13        | Product #2    | 0.916                |                 |                          |
| 14        |               | 0.912                | 0.914           | 0.832                    |

### А. Графический метод



## B. Расчетный метод

$$\text{Slope} = \left( \frac{S_y}{S_x} \right) r$$

$$Y\text{-intercept} = \Sigma y / N - (\Sigma x / N \times \text{slope})$$

$$r = \frac{N\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{N(N-1)S_x S_y}$$

$$\text{Endotoxin concentration} = \frac{\Delta \text{Abs.} - (y\text{-intercept})}{\text{slope}}$$

x = Endotoxin concentration in EU/ml.

y = Mean  $\Delta$  Absorbance Value.

N = Number of standards used.

$\Sigma x$  = Summation of concentration of standards used in EU/ml.

$\Sigma y$  = Summation of Mean  $\Delta$  Absorbance Values.

$\Sigma xy$  = Summation of the standard concentrations times Mean  $\Delta$  Absorbance Values.

$$S_x = \text{Standard deviation of } x = \sqrt{\frac{N\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}{N(N-1)}}$$

$$S_y = \text{Standard deviation of } y = \sqrt{\frac{N\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{N(N-1)}}$$

Calculations using Example Data: (Page 19)

$$N = 4$$

$$\Sigma x = 1.85 = (0.100 + 0.250 + 0.500 + 1.00)$$

$$\Sigma y = 1.76 = (0.088 + 0.235 + 0.482 + 0.950)$$

$$\Sigma xy = 1.26 = (0.100 \times 0.088) + (0.250 \times 0.235) + (0.500 \times 0.482) + (1.00 \times 0.950)$$

$$S_x = 0.394$$

$$S_y = 0.378$$

$$r = \frac{4(1.26) - (1.85)(1.76)}{4(4-1)(0.394)(0.378)} = 1.00$$

$$\text{Slope} = \frac{0.378}{0.394} \times 1.00 = 0.959$$

$$Y\text{-intercept} = \frac{1.76}{4} - \left[ \frac{1.85}{4} \times 0.959 \right]$$

$$Y\text{-intercept} = 0.440 - (0.463 \times 0.959) = -0.004$$

$$\begin{aligned}
 \text{Product \#1} \\
 \text{Endotoxin Conc. EU/ml} &= \frac{0.300 - (-0.004)}{0.959} \\
 &= \frac{0.304}{0.959} \\
 &= 0.317 \text{ EU/ml}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Product \#2} \\
 \text{Endotoxin Conc. EU/ml} &= \frac{0.832 - (-0.004)}{0.959} \\
 &= \frac{0.836}{0.959} \\
 &= 0.872 \text{ EU/ml}
 \end{aligned}$$

**Внимание:** если концентрация эндотоксинов в испытуемом образце составляет более чем 1,0 ЕЭ/мл, следует развести образец в пять раз водой для ЛАЛ-теста и проверить повторно. Далее следует рассчитать концентрацию эндотоксинов в разведенном образце и умножить на пять для того, чтобы определить концентрацию в исходном образце.

### Ингибирование

Ингибирование реакции возникает в том случае, если вещества, присутствующие в испытуемом препарате, мешают протеканию реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксинами. В хромогенном анализе ингибирование проявляется в более низком значении разницы светопоглощения, что может показывать более низкий уровень содержания эндотоксинов, чем реальный уровень содержания эндотоксинов в образце. Отсутствие ингибирования должно быть определено для каждого испытуемого препарата, или неразведенного, или в соответствующем разведении.

Для того, чтобы убедиться в том, что испытуемый препарат не ингибирует реакцию, к испытуемому образцу или его разведению добавляют известное количество эндотоксина, равное 0,4 ЕЭ/мл (спайк). Раствор препарата, содержащий добавленный эндотоксин, анализируется вместе с образцом препарата, не содержащим эндотоксина, при этом определяется концентрация в них эндотоксинов. Разница между двумя полученными значениями концентрации эндотоксинов должна равняться известной концентрации эндотоксинов в спайке  $\pm 25\%$ .

Положительный контроль испытуемого препарата (или его разведения) может быть приготовлен как в одном из следующих примеров:

1. Приготовьте раствор эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл в растворе испытуемого препарата или его разведения. Для этого разведите исходный раствор эндотоксина в 1/Х раз, где Х равен концентрации эндотоксина в исходном растворе. В качестве растворителя используйте испытуемый препарат или его разведение. Интенсивно перемешайте полученный раствор на вортексе не менее 1 минуты. Например, если концентрация исходного раствора эндотоксина составляет 24 ЕЭ/мл, то первое разведение эндотоксина будет равно 1/24 или 0,1 мл исходного раствора эндотоксина в 2,3 мл раствора испытуемого препарата (или его разведения).

2. Чтобы приготовить раствор эндотоксина с концентрацией 0,4 ЕЭ/мл в растворе испытуемого препарата (или его разведения), разведите раствор эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл в 2,5 раза. В качестве растворителя используйте раствор испытуемого препарата (или его разведение). Это можно сделать, смешав 1,0 мл раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл в растворе испытуемого препарата (или его разведения) с 1,5 мл раствора испытуемого препарата (или его разведения). Получившийся раствор интенсивно перемешайте на вортексе не менее 1 минуты.

Если обнаружено, что испытуемый препарат или его разведение ингибирует реакцию, то для преодоления ингибирования может потребоваться его дальнейшее разведение.

#### Пример: Определение неингибирующего разведения

| Концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл) |                    |                    |                        |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| Разведения препарата             | Образец без спайка | Образец со спайком | Разница в концентрации |
| 1/10                             | 0,18               | 0,28               | 0,10 ингибирующая      |
| 1/20                             | 0,11               | 0,36               | 0,25 ингибирующая      |
| 1/40                             | <0,1               | 0,44               | 0,44 неингибирующая    |

Возможно сначала проверить препарат на наличие ингибирования путем анализа 10-ти кратных разведений препарата. Как только будет определено приблизительное значение неингибирующего разведения, можно определить точное значение разведения путем анализа последовательных двукратных разведений вокруг определенного диапазона.

#### Ограничения теста и особые указания

Степень ингибирования/усиления реакции зависит от концентрации испытуемого образца. Если исследуются несколько концентраций испытуемого препарата, то для каждой из них необходимо установить независимые условия проведения анализа.

В хромогенном анализе по конечной точке степень ингибирования/усиления реакции может отличаться от таковой в традиционном гель-тромб тесте.

Может оказаться необходимым доведение значения рН испытуемого препарата до диапазона значений 6,0 – 8,0, используя апиrogenные растворы гидроксида натрия или хлороводородной кислоты для того, чтобы преодолеть ингибирование.

#### Окрашенные образцы

В хромогенном анализе по конечной точке особого внимания могут потребовать образцы, которые сами имеют значительную окраску. Кроме того, при использовании 25% уксусной кислоты в качестве стоп-реагента следует иметь в виду, что некоторые образцы, такие как определенные тканевые культуральные среды, могут в кислой среде развивать желтую окраску.

Быстрым тестом на предмет того, следует ли принимать во внимание собственную окраску испытуемого препарата, может служить постановка проверочной реакционной пробирки. Добавьте 50 мкл испытуемого образца, 150 мкл воды для ЛАЛ-теста и 100 мкл соответствующего стоп-реагента без инкубирования. Измерьте величину оптической

плотности этого раствора при длине волны 405-410 нм. Если величина оптической плотности значительно выше, чем величина оптической плотности у воды для ЛАЛ-теста, то окраску испытуемого препарата следует принимать во внимание.

Во время анализа приготовьте пустой образец, смешав 50 мкл испытуемого образца, 150 мкл воды для ЛАЛ-теста и 100 мкл соответствующего стоп-реагента без инкубирования. В добавление, проанализируйте испытуемый препарат вместе с соответствующими стандартами эндотоксина и отрицательным контролем. Для того, чтобы рассчитать разницу в оптической плотности, следует вычесть величину оптической пустого образца также как и значение оптической плотности для отрицательного контроля. Но в случае, если необходимо рассчитать разницу в оптической плотности между стандартами эндотоксина и неокрашенного образца, следует использовать только отрицательный контроль.

Если испытуемый образец имеет собственную значительную окраску ( $>0,5$  единиц оптической плотности), его следует развести и проверить повторно. При этом следует использовать фактор разведения образца для расчета окончательной концентрации эндотоксина в испытуемом препарате.

### **Корреляция с другими методами**

ФДА регулирует официальное использование ЛАЛ-теста в США. Активность различных препаратов эндотоксина различается как в традиционном гель-тромб тесте, так и в хромогенном анализе. Контрольный стандарт эндотоксина, поставляемый в данном наборе, был сравнен с национальным стандартом эндотоксина в хромогенном анализе, и его активность указана в сертификате анализа на конкретную серию реактива. Калибровочная кривая, построенная с использованием данного стандарта, охватывает диапазон от 0,1 до 1,0 ЕЭ/мл относительно к национальному стандарту эндотоксина. Однако, следует помнить, что традиционный гель-тромб тест стандартизован двукратными разведениями, таким образом, вариации возникают гораздо чаще в сравнении с хромогенным анализом, в котором стандартизация постоянна, а отклонения минимальны.

### **Вниманию для покупателей из других стран**

Другие регуляторные агентства могут принимать другие стандарты выполнения процедуры анализа, которые должны соответствовать их требованиям.

## Литература

1. Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98:325 (1956).
2. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265 (1964).
3. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337 (1964).
4. Levin, J. and F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186 (1968).
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. Thromb. Diath. Haemorrh. 23:170 (1970).
6. Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. Thromb. Res. 2:55 (1973).
7. Young, N.S., J. Levin, and R.A. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. J. Clin. Invest. 51:1790 (1972).
8. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter Bacterial Endotoxins Test. United States Pharmacopeia (USP).
9. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. European Pharmacopoeia (EP).
10. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. Japanese Pharmacopoeia (JP).
11. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers (June 2012).



Тел: +7 499 682 61 09  
E-mail: mail@algimed.ru