

LONZA



**ИНСТРУКЦИЯ
к наборам реактивов Pyrogen-5000
для выполнения кинетического
турбидиметрического ЛАЛ-теста**

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 в комбинации с инкубационным микропланшетным ридером и соответствующим программным обеспечением для определения эндотоксинов фотометрическим 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 (9).
- Процедуры, описанные далее, основаны на указаниях Фармакопеи.

Предупреждение

Использовать только для *in Vitro* диагностики. ЛАЛ-реактив PYROGENT-5000 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 (9).

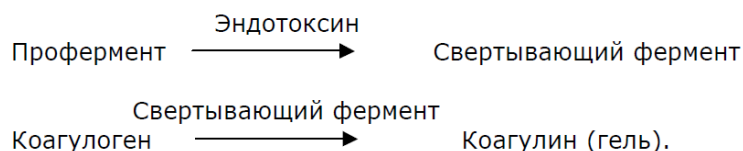
Объяснение теста

PYROGENT-5000 – это количественный кинетический метод определения содержания бактериальных эндотоксинов Грам-отрицательных бактерий. Испытуемый образец смешивают с разведенным ЛАЛ-реактивом, помещают в инкубационный микропланшетный ридер и автоматически проводят измерение оптической плотности в процессе появления мутности. Время, необходимое для появления мутности (время реакции), обратно пропорционально содержанию эндотоксинов в образце. Таким образом, если в образце содержится большое количество эндотоксина, то реакция протекает быстро; при меньшем содержании эндотоксинов в образце время реакции увеличивается. Концентрация эндотоксинов в неизвестных образцах определяется 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 (8) выделили и очистили свертывающий белок из лизата амебоцитов мечехвостов и показали, что реакция с эндотоксином является ферментативной. Теллер и Келли показали, что активация лизата эндотоксинами может быть измерена фотометически.

Принципы реакции



Эндотоксины Грам-отрицательных бактерий катализируют превращение профермента в активный свертывающий фермент в ЛАЛ-реактиве (8). Начальная скорость этого превращения определяется концентрацией присутствующего эндотоксина. Активированный свертывающий фермент гидролизует специфические связи в свертывающем белке коагулогене, который также присутствует в ЛАЛ-реактиве. Образующийся в результате гидролиза коагулин самоассоциируется и формирует желатиноподобный гель. В турбидиметрическом анализе измеряется скорость развития мутности (оптическая плотность), которая предшествует формированию геля.

Комплектация и условия хранения

ЛАЛ-реактив PYROGENT-5000

(T50-300, T50-600) Флакон с желтой этикеткой

ЛАЛ-реактив содержит лизат, приготовленный из циркулирующих амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus*. **Перед использованием растворите содержимое флакона с помощью буфера для разведения ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000 в соответствии со следующей таблицей:**

ЛАЛ-реактив PYROGENT-5000	Требуемый буфер для разведения ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000
T50-300	5,2 мл/флак
T50-600	10,4 мл/флак

Перемешайте флакон плавным покачиванием, избегая пенообразования.

Важно: перед использованием подождите около 2-х минут, чтобы позволить пузырькам подняться наверх флакона.

Неразведенный ЛАЛ-реактив PYROGENT-5000 следует хранить в холодильнике при температуре +2 - +8°C. Следует избегать хранения ЛАЛ-реактива при температуре выше 37 °C. Следует избегать хранения ЛАЛ-реактива на ярком свете. Не используйте лизат, если он стал желтого цвета или стал нерастворимый. Разведенный ЛАЛ-реактив PYROGENT-5000 стабилен в течение 8-ми часов при температуре +2 - +8°C.

Буфер для разведения ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000

(B50-300) – флакон с синей этикеткой, (B50-600) – флакон с зеленой этикеткой

Буфер предназначен для разведения ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000. Перед использованием следует дать буферу достичь комнатной температуры.

Буфер следует хранить при температуре +2 – +8°C.

Внимание: Буфер требуется для наборов, которые содержат только ЛАЛ-реактив.

Контрольный стандарт эндотоксина E. coli 055:B5 (7460) Флакон с красной этикеткой

Объем растворителя для разведения стандарта указан в Сертификате анализа и рассчитан таким образом, чтобы в полученном растворе концентрация эндотоксина составляла 100 ЕЭ/мл (или МЕ/мл). Разведите флакон указанным объемом воды для ЛАЛ-теста. Интенсивно перемешайте флакон на вортексе на высокой скорости не менее 15 минут. Перед последующим использованием исходный раствор должен достичь комнатной температуры и быть перемешан в течение 15 минут на вортексе, Это является очень важным, так как молекулы эндотоксина при хранении в растворе могут прилипнуть к стенкам флакона. Сертификат анализа доступен по ссылке www.lonza.com/coa.

Лиофилизированный эндотоксин следует хранить при температуре +2 – +8°C. Разведенный эндотоксин стабилен в течение 4-х недель при температуре +2 - +8°C.

Внимание: контрольный стандарт эндотоксина не включен в упаковки, содержащие только флаконы с лизатом. В этом случае его требуется заказывать отдельно.

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 турбидиметрическом анализе должно быть установлено по национальному стандарту эндотоксина (RSE).

Материалы и оборудование, не включенные в поставку

1. Вода для ЛАЛ-теста (#W50-640, #W50-100, #W50-500 или эквивалент). Вода для ЛАЛ-теста является эквивалентом воды для ВЕТ.
2. Растворы гидроксида натрия 0.1М или хлороводородной кислоты 0.1М, приготовленные на воде для ЛАЛ-теста для выравнивания pH испытуемого образца, если это необходимо.
3. Одноразовые апирогенные пробирки для разведения (13 × 100 мм, #N207 или аналог).
4. Серологические пипетки в индивидуальной упаковке.
5. Автоматические пипетки со стерильными наконечниками, индивидуально упакованными или в штативах.
6. Одноразовые стерильные планшеты (#25-340 или аналог).
Внимание: перед использованием в рутинных анализах планшеты должны быть пре-квалифицированы (9).
7. Восьмиканальный дозатор.
8. Резервуары для реагентов (#00190035 или аналог).
9. Микропланшетный ридер (ELx808™ IU , #25-315 или аналог).
10. Программное обеспечение WinKQCL™.
11. Таймер.
12. Вортекс.

13. Для наборов, не включающих эндотоксин: контрольный стандарт эндотоксина (контрольный стандарт эндотоксина должен соответствовать ЛАЛ-реактиву).
14. Для наборов, не включающих буфер: буфер для разведения ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000.

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 возрасти. Например, можно хранить образцы при температуре +2 - +8 °С 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.

Виды кинетического турбидиметрического анализа с использованием реактива PYROGENT-5000

Интегральной частью комплекса для проведения турбидиметрического кинетического анализа с использованием ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000 являются микропланшетный ридер со встроенным модулем инкубирования и программное обеспечение WinKQCL. Важно иметь представление о работе микропланшетного ридера, а также обладать навыками работы с программным обеспечением WinKQCL. В случае необходимости получения более детализированной информации следует обратиться к Руководствам пользователя для микропланшетного ридера и программного обеспечения WinKQCL.

С помощью ЛАЛ-реактива для турбидиметрического кинетического теста PYROGENT-5000 можно проводить четыре основных типа анализов, каждый из которых предназначен для выполнения различных аспектов проверки препаратов в ЛАЛ-тесте.

1. Рутинные анализы

В рутинных анализах определяется концентрация бактериальных эндотоксинов в неизвестном образце путем сравнения с серией стандартных концентраций эндотоксина.

Частью рутинного анализа является постановка положительного контроля испытуемого препарата (Positive Product Control, PPC) для определения возможности

ингибирования/усиления реакции (раздел 2 ниже). Положительный контроль испытуемого препарата представляет собой испытуемый препарат в выбранном разведении, к которому добавлен эндотоксин в известной концентрации (спайк). Программа WinKQCL автоматически вычисляет концентрацию эндотоксина в положительном контроле испытуемого препарата путем сравнения полученного значения с известной концентрацией эндотоксина в спайке .

2. Ингибирование/усиление реакции

Реакция ЛАЛ-реактива с эндотоксином является ферментативной, поэтому она протекает при определенном значении pH и при определенной концентрации дивалентных катионов в растворе. Испытуемые препараты могут изменять оптимальные условия проведения реакции в такой степени, что лизат перестает быть чувствительным к присутствию эндотоксинов. В этом случае отрицательные результаты, полученные для растворов испытуемых препаратов не обязательно будут означать отсутствие эндотоксинов в растворе.

Назначение анализа на ингибирование/усиление реакции – определить, до какой степени необходимо развести испытуемый препарат, чтобы преодолеть ингибирование. Каждое разведение испытуемого образца должно сопровождаться положительным контролем препарата (PPC). Программное обеспечение WinKQCL™ автоматически рассчитывает концентрацию эндотоксина в положительном контроле испытуемого препарата и сравнивает ее с известной концентрацией эндотоксина в спайке. Таким образом можно определить, в каком разведении испытуемый препарат не будет ингибировать реакцию.

3. RSE/CSE

Анализ RSE/CSE предназначен для того, чтобы определить активность Контрольного стандарта эндотоксина (CSE), по сравнению с национальным (референсным) стандартом эндотоксина (RSE).

В анализе ставится серия разведений RSE и одна или более серия разведений контрольного стандарта эндотоксина. В зависимости от способа выражения концентрации контрольного стандарта эндотоксина, программное обеспечение WinKQCL™ автоматически рассчитывает среднюю активность стандарта, выраженную в ЕЭ/нг или ЕЭ/мл. Пользователь также имеет возможность выбрать другие единицы выражения активности, отличные от ЕЭ или нг.

4. Начальная квалификация

Этот вид анализа разработан в соответствии с требованиями, описанными в Фармакопее (9). **Этот анализ является частью валидации ЛАЛ-теста и должен проводиться для каждой новой серии ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000.**

В данном анализе рассчитывается log/log линейная корреляция времени реакции для каждой повторности стандарта эндотоксина. В других видах анализа используется среднее время реакции для всех повторностей для каждой концентрации стандарта эндотоксина.

В анализе по начальной квалификации не предусмотрено включение в анализ испытуемых образцов.

Подготовка реагентов

Реагенты должны быть нагреты до комнатной температуры перед началом использования.

Для расчета концентраций эндотоксина в неизвестных образцах в каждом анализе используется стандартная кривая с известными концентрациями эндотоксина.

Поскольку содержание эндотоксинов может находиться в широком диапазоне значений, можно построить стандартную калибровочную кривую в соответствии с ожидаемыми значениями эндотоксинов в испытуемом образце. Для построения стандартной калибровочной кривой требуется минимум три значения концентрации стандарта эндотоксина.

Анализ с использованием ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000 предполагает возможность построения калибровочной кривой в диапазоне концентраций от 0,01 ЕЭ/мл до 100 ЕЭ/мл. Однако, пользователь может сократить диапазон концентраций калибровочной кривой в зависимости от специфических требований к испытуемому препарату. Данные показывают, что сокращение диапазона концентраций стандартной калибровочной кривой в турбидиметрическом кинетическом анализе может улучшить точность определения предполагаемых значений эндотоксинов в испытуемых образцах. Рекомендуется, чтобы пользователь был ознакомлен с требованиями Фармакопеи к проведению кинетических методов проведения ЛАЛ-теста перед тем как устанавливать диапазон значений концентраций эндотоксина для построения стандартной калибровочной кривой, используемой при рутинной проверке испытуемых образцов (9).

В таблице ниже представлена схема подготовки серии разведений стандарта эндотоксина из контрольного стандарта эндотоксина, поставляемого в наборе. Для построения стандартной калибровочной кривой не обязательно должны быть использованы все приведенные концентрации эндотоксина. Также могут быть использованы другие схемы разведения эндотоксина, а также контрольные стандарты эндотоксина, не поставляемые в данном наборе. Если в анализе используется контрольный стандарт эндотоксина не из набора, может потребоваться калибровка контрольного стандарта по национальному стандарту эндотоксина для определения активности КСЭ.

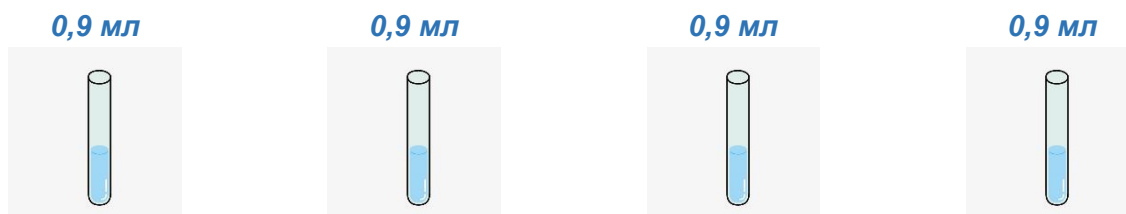
Внимание: для подготовки разведений КСЭ не рекомендуется использование пластиковых пробирок.

Концентрация эндотоксина, ЕЭ/мл	Объем воды для ЛАЛ-теста, мл	Объем раствора эндотоксина, добавляемого к воде для ЛАЛ-теста
10,0	0.9	0.1 мл раствора 100 ЕЭ/мл
1,0	0.9	0.1 мл раствора 10 ЕЭ/мл
0,1	0.9	0.1 мл раствора 1 ЕЭ/мл
0,01	0.9	0.1 мл раствора 0,1 ЕЭ/мл

Пробирки для приготовления серии разведений КСЭ подписывают следующим образом:



Во все пробирки вносят по 0,9 мл воды для ЛАЛ-теста.



1. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **10 ЕЭ/мл** в пробирку **#10** вносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 100 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.
2. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **1 ЕЭ/мл** в пробирку **#1** вносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 10 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.
3. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **0,1 ЕЭ/мл** в пробирку **#0,1** вносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 1 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.
4. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **0,01 ЕЭ/мл** в пробирку **#0,01** вносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.

Процедура анализа

Важно: непосредственно во время проведения анализа ридер должен быть расположен в зоне, свободной от значительной вибрации (например, от центрифуги, шейкеров и т.д.).

Для получения более детальной информации по проведению кинетического турбидиметрического анализа с использованием ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000 следует использовать Руководство пользователя для спектрофотометра и программного обеспечения WinKQCL.

1. Для проведения анализа создайте в программе новую карту планшета. В карте планшета должны быть указаны: имя аналитика, вид анализа, номера серий используемых реактивов, количество стандартных разведений эндотоксина и их концентрации, количество повторностей и схема расположения стандартов и образцов на планшете.
2. Следует выбрать тип анализа PYROGENT-5000. Не следует проводить изменение параметров, указанных в таблице, лицам, не обладающим соответствующей квалификацией:

Delta t (seconds)	60
Measurement filter (nm)	340
Delta mOD	30
Number of Reads	100

3. Распечатайте карту планшета, чтобы использовать ее при внесении стандартов и образцов в микропланшет.
4. Начните анализ, следуя подсказкам программы WinKQCL™.
5. Аккуратно внесите в соответствующие лунки планшета: по 100 мкл воды для ЛАЛ-теста, стандартов эндотоксина, растворов испытуемых препаратов, растворов положительного контроля испытуемых препаратов (см. страницу 13 для информации о постановке положительного контроля).
Внимание: следует избегать образования пузырей!
6. Поместите заполненный планшет в ридер и закройте крышку.
7. Проведите преинкубирование планшета в течение не менее 10 минут при 37°C ± 1°C.
8. Незадолго до конца преинкубирования разведите необходимое количество флаконов с ЛАЛ-реактивом PYROGENT-5000 с помощью буфера для разведения ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000 (5,2 мл для флаконов Т50-300 и 10,4 мл для флаконов Т50-600). Перемешайте флаконы осторожно, но тщательно. Дайте возможность пузырькам подняться наверх флакона.
Внимание: Не перемешивайте ЛАЛ-реактив на вортексе.
9. Поместите раствор ЛАЛ-реактива в резервуар для реагентов и осторожно перемешайте реактив, покачивая резервуар из стороны в сторону.
10. Используя 8-канальный дозатор, внесите по 100 мкл ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000 во все лунки, начиная с первого ряда (А1-Н1) и продолжая до последнего используемого ряда. Вносить ЛАЛ-реактив следует максимально быстро.
Внимание: избегайте образование пузырей!
11. Сразу же нажмите кнопку «ОК» в программе WinKQCL, чтобы начать тест.
Внимание: анализ проводится в планшете без крышки.

Критерии анализа

Линейность

Должна соблюдаться линейность стандартной кривой, построенной в диапазоне различных концентраций эндотоксина. В анализе по начальной квалификации должно быть использовано не менее 3 концентраций стандарта эндотоксина, охватывающих исследуемый диапазон концентраций, а также отрицательный контроль с водой для ЛАЛ-теста. В соответствии с требованиями для анализа по начальной квалификации все испытуемые растворы проверяются как минимум в трех повторностях. При увеличении диапазона калибровочной кривой на каждый следующий log интервал следует добавлять следующую концентрацию стандарта эндотоксина.

Абсолютное значение коэффициента корреляции (r) для стандартной калибровочной кривой должно быть ≥ 0.980 .

Воспроизводимость

Повторы образцов необходимы, чтобы минимизировать коэффициент вариации. Коэффициент вариации (C.V.) рассчитывается в процентах как частное от стандартного отклонения времени реакции образца к среднему времени реакции. %C.V. должен быть менее 10 %. Из практики – приемлемое значение C.V. составляет 3–4%.

Расчет концентрации эндотоксина

Программное обеспечение ридера в течение всего времени анализа постоянно измеряет светопоглощение при длине волны 340 нм в каждой лунке. Используя в качестве отправной точки первое считывание в каждой лунке, ридер определяет время, требуемое для достижения заданного порога значения оптической плотности, равного 0,03 единиц оптической плотности. Это время определяется как **время реакции**. Программное обеспечение WinKQCL автоматически выполняет log/log линейную корреляцию времени реакции каждого стандарта с его соответствующей концентрацией эндотоксина. Параметры стандартной калибровочной кривой отображаются в печатной форме отчета. Если абсолютное значение коэффициента корреляции r составляет ≥ 0.980 , для построения стандартной калибровочной кривой может быть использована полиномиальная модель, и, в свою очередь, может быть предсказана концентрация эндотоксинов в испытуемом образце. Данная полиномиальная модель калибровочной кривой (POWERCURVE) является важным свойством программного обеспечения WinKQCL™ (см. раздел POWERCURVE на стр.11).

Линейная регрессия

Информация, приведенная ниже, представляет собой пример того, как программное обеспечение WinKQCL™ рассчитывает log/log линейную корреляцию и концентрацию эндотоксина в неизвестных образцах. **Выполнять данный расчет отдельно нет необходимости.** Для каждого образца каждого испытуемого препарата программное обеспечение WinKQCL™ рассчитывает соответствующее значение содержания эндотоксинов по времени реакции для данного образца. Программа сама автоматически пересчитывает окончательное значение содержания эндотоксинов в образце, исходя из разведения препарата, проверяемого в анализе.

Линейная корреляция

Linear Correlation

Example Calculations

Standards	Concentration	Mean Reaction Time (Sec)	Log Concentration	Log Mean Reaction Time
Neg. Control	—	Unreactive	—	—
S1	0.010 EU/ml	3103	-2.000	3.492
S2	0.100 EU/ml	1484	-1.000	3.171
S3	1.000 EU/ml	808	-0.000	2.907
S4	10.000 EU/ml	485	1.000	2.686
S5	100.000 EU/ml	312	2.000	2.494
Samples				
1	—	1576	—	3.198
2	—	943	—	2.975

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

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

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

$$\text{Endotoxin concentration} = \text{antilog} \left[\frac{\log \text{Mean Reaction Time} - Y \text{ int.}}{\text{slope}} \right]$$

$$x = \log_{10} \text{Endotoxin concentration in EU/ml.}$$

$$y = \log_{10} \text{Mean Reaction Time.}$$

N = Number of standards used.

$\sum x$ = Summation of \log_{10} concentration of standards used in EU/ml.

$\sum y$ = Summation of \log_{10} Reaction Time.

$\sum xy$ = Summation of the \log_{10} standard concentrations times \log_{10} Mean Reaction Time.

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

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

Calculations using Example Data:

$$N = 5$$

$$\sum x = 0.000 = (-2.000 - 1.000 + 0.000 + 1.000 + 2.000)$$

$$\sum y = 14.75 = (3.492 + 3.171 + 2.907 + 2.686 + 2.494)$$

$$\sum xy = -2.481 = (-2.000 \times 3.492) + (-1.000 \times 3.171) + (0.000 \times 2.907) + (1.000 \times 2.686) + (2.000 \times 2.494)$$

$$S_x = 1.581$$

$$S_y = 0.394$$

$$r = \frac{5[-2.481] - (0.000)(14.75)}{5(5-1)(1.581)(0.394)} = -0.996$$

$$\text{Slope} = \frac{0.394}{1.581} \times -0.996 = -0.248$$

$$Y\text{-intercept} = \frac{14.75}{5} - \left[\frac{0.000}{5} \times (-0.248) \right] = 2.950 - [(0) \times (-0.248)] = 2.950$$

$$\begin{aligned} \text{Sample 1} \\ \text{Endotoxin Conc. EU/ml} &= \text{antilog} \left[\frac{3.198 - 2.950}{-0.248} \right] \\ &= \text{antilog} (-1.000) \\ &= 0.100 \text{ EU/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Sample 2} \\ \text{Endotoxin Conc. EU/ml} &= \text{antilog} \left[\frac{2.975 - 2.950}{-0.248} \right] \\ &= \text{antilog} (-0.101) \\ &= 0.793 \text{ EU/ml} \end{aligned}$$

POWERCURVE

Если абсолютное значение коэффициента корреляции (r) ≥ 0.980 , может быть использована полиномиальная модель для построения стандартной калибровочной кривой и для определения концентрации эндотоксинов в образцах. Было установлено, что данная полиномиальная модель (POWERCURVE) улучшает точность определения концентрации эндотоксинов свыше пяти порядков диапазона концентраций калибровочной кривой. При использовании модели POWERCURVE необходимо использовать программное обеспечение WinKQCL.

При использовании модели POWERCURVE генерируется стандартная калибровочная кривая, используя соответствующие десятичные логарифмы значений концентрации эндотоксина для того, чтобы задать полиномиальное уравнение. Степень полиномиального уравнения, используемого для построения кривой регрессии, определяется числом стандартов эндотоксина в анализе. Степень полинома всегда будет на единицу менее, чем количество концентраций эндотоксина, с максимальным значением степени полинома, равным четырем, для анализов, в которых используется пять и более концентраций эндотоксина, и с минимальным значением степени полинома, равным двум, для анализов, в которых используется три концентрации эндотоксина.

Используя программное обеспечение WinKQCL POWERCURVE, можно найти решение к данному полиномиальному уравнению. Информация, предоставленная ниже, является примером решения полиномиального уравнения с использованием тех же данных из примера линейной корреляции, приведенного выше.

Polynomial [POWERCURVE~] Model

$$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$$

$$A = 2.90741$$

$$B = -0.24066$$

$$C = 0.02111$$

$$D = -0.00219$$

$$E = 0.00007$$

Параметры стандартной кривой выводятся на печатную форму отчета. Программное обеспечение WinKQCL POWERCURVE использует данные параметры для того, чтобы рассчитать соответствующую концентрацию эндотоксинов, исходя из времени реакции по каждому образцу. Программа автоматически пересчитывает окончательное значение концентрации эндотоксинов, исходя из степени разведения для каждого препарата.

Важно отметить, что полиномиальная модель POWERCURVE не может быть использована для анализа по начальной квалификации. В этом случае должна быть использована линейная регрессия. Кроме того, использование полиномиальной модели POWERCURVE применимо только с реактивами Kinetic-QCL и PYROGENT-5000, поставляемыми Лонзой.

Ингибирование

Ингибирование реакции возникает в том случае, если вещества, присутствующие в испытуемом препарате, мешают протеканию реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксинами. В кинетическом турбидиметрическом анализе ингибирование проявляется в удлинении времени реакции, 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 (спайк).

Рекомендуется, чтобы конечная концентрация эндотоксина в образце равнялась 0,1 ЕЭ/мл. Для образцов, которые могут изначально содержать эндотоксины в концентрации более 1 ЕЭ/мл, рекомендуется, чтобы конечная концентрация эндотоксинов равнялась 1,0 ЕЭ/мл.

В анализе на проверку ингибирования/усиления реакции положительный контроль испытуемого препарата анализируется вместе с самим испытуемым препаратом, и автоматически высчитывается относительное содержание эндотоксинов в образце, так же, как и в положительном контроле испытуемого препарата. Полученное значение

определенной концентрации эндотоксина в положительном контроле должно равняться значению добавленного эндотоксина в пределах определения 50 - 200%.

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

Пробирочный метод

Добавьте 50 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 10 ЕЭ/мл к 4,95 мл испытуемого образца (или его разведения). Данный раствор содержит эндотоксин в концентрации 0,1 ЕЭ/мл. Перед использованием интенсивно перемешайте полученный раствор на вортексе в течение одной минуты.

Перенесите 100 мкл данного раствора в 96-ти луночный планшет в соответствии с картой планшета.

Планшетный метод #1

Перенесите по 10 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл в каждую лунку 96-ти луночного планшета с положительным контролем испытуемого препарата в соответствии с картой планшета. Добавьте в эти лунки по 0,1 мл испытуемого образца (или его разведения). В каждой лунке теперь содержится раствор с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл эндотоксина. Осторожно перемешайте растворы, постукивая по краям планшета.

Планшетный метод #2

Перенесите по 0,1 мл испытуемого образца (или его разведения) в лунки 96-ти луночного планшета с положительным контролем испытуемого препарата в соответствии с картой планшета. Добавьте к этим лункам по 10 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл. В каждой лунке теперь содержится раствор с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл эндотоксина. Осторожно перемешайте растворы, постукивая по краям планшета.

Если обнаружено, что испытуемый препарат или его разведение ингибируют кинетическую турбидиметрическую реакцию, может потребоваться дальнейшее разведение испытуемого препарата для того, чтобы преодолеть ингибирование.

Пример: Определение неингибирующего разведения

Разведения препарата	Концентрация эндотоксина, определенная в положительном контроле
1/10	0,015 - ингибирование
1/20	0,042 – ингибирование
1/40	0,110 – ингибирания нет

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 турбидиметрическом кинетическом анализе 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 апирогенные растворы гидроксида натрия или хлороводородной кислоты для того, чтобы преодолеть ингибирование.

Мутные образцы

При проверке образцов, обладающих значительной мутностью, может потребоваться их очищение от мутности перед анализом. Очищение от мутности может быть достигнуто центрифугированием, фильтрацией или разведениями образца.

Архивированная калибровочная кривая

Программа WinKQCL позволяет использовать архивированную стандартную калибровочную кривую. При условии, что номера серий ЛАЛ-реактива PYROGENT-5000, воды для ЛАЛ-теста, буферного раствора и эндотоксина, а также параметры планшета соответствуют тем, которые были использованы для построения валидированной архивированной стандартной кривой, архивированная стандартная кривая может быть использована вместо построения новой калибровочной кривой на планшете.

Если используется архивированная калибровочная кривая, то должен быть поставлен один контроль, содержащий эндотоксин в концентрации, равной середине калибровочной кривой, на логарифмической основе, между самой высокой и самой низкой концентрациями эндотоксина. Определенная концентрация эндотоксина в этом контроле должна быть в пределах $\pm 25\%$ от расчетного значения.

Например, в анализе со стандартной калибровочной кривой, охватывающей диапазон от 100,0 до 0,01 ЕЭ/мл, должен быть поставлен контроль с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл.

$\log 100,0$	=	2,0
$\log 0,01$	=	-2,0
<hr/>		
Среднее значение логарифмов	=	0,0
Антилогарифм 0,0	=	1,0

В анализе со стандартной калибровочной кривой, охватывающей диапазон от 1,0 до 0,01 ЕЭ/мл, должен быть поставлен контроль с концентрацией 0,1 ЕЭ/мл.

$\log 1,0$	=	0,0000
$\log 0,01$	=	-2,0000
<hr/>		
Среднее значение логарифмов	=	-1,0000
Антилогарифм -1,0000	=	0,1

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 турбидиметрическом анализе. Контрольный стандарт эндотоксина, поставляемый

в данном наборе, был сравнен с национальным стандартом эндотоксина в кинетическом турбидиметрическом анализе с использованием реактива PYROGENT-5000, и его активность была установлена равной 100,0 ЕЭ/мл при разведении объемом воды, указанным в сертификате анализа на каждую серию. Калибровочная кривая, построенная с использованием данного стандарта, охватывает диапазон от 0,01 до 100,0 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 кинетическим турбидиметрическим 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. Teller, J.D. and K.M. Kelly. A turbidimetric *Limulus* amebocyte assay for the quantitative determination of Gram negative bacterial endotoxin. In Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (*Limulidae*), Cohen, E., Ed., A.R. Liss, Inc., New York, N.Y. p. 423 (1979).
8. 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).
9. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter Bacterial Endotoxins Test. *United States Pharmacopeia* (USP).
10. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. *European Pharmacopoeia* (EP).
11. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. *Japanese Pharmacopoeia* (JP).
12. 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