

Pharma&Biotech

**Lonza**



## ИНСТРУКЦИЯ К НАБОРАМ РЕАКТИВОВ

### PYROGENT® И PYROGENT® Plus

**ВНИМАНИЕ: Внимательно ознакомьтесь с инструкцией перед выполнением теста.**

## НАЗНАЧЕНИЕ

Данный продукт предназначен для *in vitro* диагностики на бактериальные эндотоксины лекарственных средств для человека и животных, биологических продуктов и изделий медицинского назначения. Данный продукт не предназначен для определения эндотоксинов в образцах материалов, полученных от человека, или как средство диагностики заболеваний человека. ЛАЛ-тест является качественным тестом для определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Поставляемый Лизат Амебоцитов *Limulus* после разведения водой для ЛАЛ-теста смешивается с равным объемом испытуемого раствора. При наличии эндотоксинов в испытуемом растворе после инкубирования происходит образование геля, в случае отсутствия эндотоксинов гель не образуется.

Фармакопея описывает процедуры, которые считаются необходимыми для:

- 1) расчета значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов в фармацевтических препаратах и изделиях медицинского назначения;
- 2) валидации ЛАЛ-теста в качестве метода контроля содержания эндотоксинов в конечном продукте;
- 3) разработки протоколов проведения рутинных анализов.

Приводимые ниже правила работы основаны на требованиях Фармакопеи.

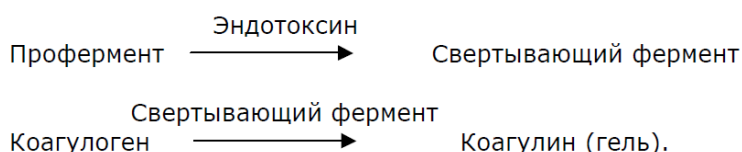
## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Только для диагностики *In Vitro*. Не предназначен для определения эндотоксемии у человека. ЛАЛ-тест может использоваться как альтернатива фармакопейному анализу пирогенности, проводимому на кроликах, в соответствии с требованиями Фармакопеи к проверке парентеральных лекарственных средств, вводимых человеку и животным, препаратов биологического происхождения и изделий медицинского назначения» (10).

## ОБЪЯСНЕНИЕ ПРИНЦИПОВ ТЕСТА

Использование ЛАЛ-теста для определения бактериальных эндотоксинов связано с открытием Банга (1), который обнаружил, что в результате инфицирования грам-отрицательными бактериями у мечехвостов *Limulus polyphemus* развивается внутрисосудистая коагуляция, приводящая к смерти животного. Позже Левин и Банг (2,3) показали, что эта коагуляция является следствием взаимодействия эндотоксина со способным свертываться белком, содержащимся в клетках крови мечехвоста - амебоцитах. Левин и Банг (4) приготовили лизат из отмытых амебоцитов, который оказался чрезвычайно чувствительным индикатором на присутствие эндотоксина. Впоследствии Солум (5,6) и Янг, Левин и Прендергаст (7) выделили из лизата амебоцитов способный свертываться белок и охарактеризовали его. Было показано, что реакция с эндотоксином является ферментативной.

## ПРИНЦИП РЕАКЦИИ



Эндотоксины грамотрицательных бактерий активируют профермент в Лизате Амебоцитов Limulus (7). Начальная скорость активации зависит от концентрации эндотоксинов. Активированный фермент (Свертывающий фермент) разрезает специфические связи в способном свертываться белке (коагулогене), который также присутствует в Лизате Амебоцитов Limulus. Получившийся коагулин самоассоциируется и формирует гель.

## **РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ, И УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ**

### **Лизат Амебоцитов Limulus, лиофилизированный (F245-06, F245-125, E209-06, E209-125, E209-25, E194-03, E194-06, E194-125) Флакон с желтой этикеткой**

Лизат приготовлен из амебоцитов мечехвоста (*Limulus polyphemus*). Его чувствительность (ЕЭ/мл) стандартизована с помощью Международного Стандарта Эндотоксина США, используемого FDA. Лизат содержит одно и двухвалентные катионы и буфер. Лизат лиофилизирован и упакован во флаконы под вакуумом. Содержимое флакона необходимо развести водой для ЛАЛ-теста перед использованием. ЛАЛ-реактив необходимо разводить непосредственно перед использованием.

Ллиофилизированный (неразведенный) Лизат Амебоцитов Limulus необходимо хранить в холодильнике при температуре +2°C+8°C. Следует оберегать лизат от воздействия температур свыше 37°C. Лизат, который хранился продолжительное время при температуре свыше 37°C или на ярком свете, может пожелтеть и/или стать нерастворимым. Лизат с такими характеристиками не может быть использован.

Разведенный лизат может храниться при температуре +2+8° С в течение 24-х часов. Для более длительного хранения необходима температура -10 ° С или ниже. Препарат нельзя держать на свету во время хранения. Использовать разведенный лизат можно в течение 4 недель после разведения. Перед использованием следует развести лизат водой для ЛАЛ-теста в соответствии с таблицей:

<b>ЛАЛ-реактив PYROGENT</b>	<b>Количество тестов во флаконе</b>	<b>Требуемый объем воды для ЛАЛ-теста</b>
F245-06	16	1,8 мл
F245-125	16	1,8 мл
E209-06	50	5,2 мл
E209-125	50	5,2 мл
E209-25	50	5,2 мл
E194-03	50	5,2 мл
E194-06	50	5,2 мл
E194-125	50	5,2 мл

### **Контрольный стандарт эндотоксина 055:B5, лиофилизированный (7360) Флакон с красной этикеткой**

Представляет собой лиофилизированный препарат очищенного эндотоксина из штамма *E. Coli* 055:B5. Каждый флакон, разведенный в соответствии с инструкциями ниже, служит для пользователя в качестве контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), активность которого была установлена с помощью настоящего Национального стандарта эндотоксина (RSE) и каждой конкретной серии ЛАЛ-реактива согласно описанной здесь процедуре. Соответствующее отношение контрольного стандарта эндотоксина к национальному стандарту, а также определенная активность КСЭ указана в сертификате анализа. Сертификат анализа доступен на сайте [www.lonza.com/coa](http://www.lonza.com/coa).

Этот препарат КСЭ с установленной активностью может быть использован вместо национального Стандарта Эндотоксина USP во всех контрольных анализах, проводимых

лабораторией с соответствующей серией лизата и в соответствии с процедурой, описанной в данной инструкции.

До разведения флакон с КСЭ хранят при температуре +2+8° С. Растворяют с помощью 5 мл воды для ЛАЛ-теста. Активность контрольного стандарта (в ЕЭ/мл) рассчитывается из отношения контрольного стандарта эндотоксина к национальному стандарту как в следующем примере:

Активность (в ЕЭ/мл) = Отношение RSE/КСЭ (в ЕЭ/нг) x \_нг/флакон ÷5,0 мл/флакон.

Хранят флакон с разведенным КСЭ при температуре +2+8° С в течение 4 недель. Готовят разведения с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл из исходного раствора только в количествах, необходимых для анализа (см. раздел «Подготовка реактивов»). Не хранят и не используют приготовленные разведения эндотоксина более чем 1 день.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** Содержимое пирогенно. Не допускать введение человеку.

**ВНИМАНИЕ:** Эндотоксин не включен, но требуется для наборов, содержащих только лизат.

## **МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР**

1. Вода для ЛАЛ-теста (#W50-640 или эквивалент). Вода для ЛАЛ-теста эквивалентна Воде для теста на бактериальные эндотоксины (ВЕТ).
2. Пипетки на 1,0 мл; 5,0 мл; 10,0 мл и 100 мкл, апиrogenные, свободные от эндотоксинов.
3. Апиrogenные стеклянные пробирки 10x75 мм для проведения реакции (#201, #205 или эквивалент) (см. раздел «Сбор и подготовка образцов для процедуры стерилизации»).
4. Апиrogenные стеклянные пробирки 13x100 мм для приготовления разведений (#207 или эквивалент) (см. раздел «Сбор и подготовка образцов для процедуры стерилизации»).
5. Натрия гидроксид, 0,1N, или хлороводородная кислота, 0,1N, растворенные в воде для ЛАЛ-теста, для доведения, при необходимости, значения рН испытуемого образца.
6. Контрольный стандарт эндотоксина (контрольный стандарт, который был протестирован с данной серией ЛАЛ-реактива).
7. Термоблок или водяная баня с отключенной циркуляцией, выдерживающие температуру 37° С±1° С.
8. Штатив для пробирок.
9. Таймер.
10. Вихревая мешалка.

## **СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Следует использовать технику асептической работы для того, чтобы избежать контаминации микробами или эндотоксинами. Все материалы, контактирующие с

испытуемым образцом или реактивами, должны быть апирогенными. Материалы из стекла могут считаться апирогенными после выдерживания их при температуре 250°C в течение 30 минут. Должны быть выполнены соответствующие предосторожности, чтобы избежать последующей контаминации из окружающей среды депириогенизированных материалов.

Как правило, большинство стерильных индивидуально упакованных пластиковых пипеток и наконечников могут считаться апирогенными. Однако вышеуказанные материалы следует протестировать перед регулярным использованием.

Может потребоваться довести значение pH раствора испытуемого образца до диапазона 6,0-8,0, используя апирогенные растворы натрия гидроксида или хлороводородной кислоты (8,9). Всегда следует измерять значение pH аликвоты испытуемого образца, чтобы избежать контаминации испытуемого образца pH-электродом. Таким образом нельзя корректировать pH растворов, имеющих малую буферную емкость.

Испытуемые образцы должны храниться таким образом, чтобы вся бактериологическая активность в них была остановлена, иначе со временем уровень содержания эндотоксинов в них может увеличиваться. Например, образцы можно хранить в течение 24 часов при температуре +2+8° С, при хранении более 24-х часов их необходимо заморозить. Конечный пользователь должен сам отвалидировать использование соответствующих контейнеров и условий хранения для своих испытуемых образцов.

Если емкость с растворителем для ЛАЛ-реактива была ранее открыта, или растворитель был поставлен не Лонзой, следует проверить сам растворитель отдельно на содержание эндотоксинов.

## **ПОДГОТОВКА РЕАКТИВА**

Перед использованием следует дать реактивам нагреться до комнатной температуры.

1. Растворение ЛАЛ-реактива.

**Предупреждение! Не растворять до момента непосредственного использования.**

А. Растворяют лиофилизированный лизат путем добавления 1,8 мл воды для ЛАЛ-теста к флакону на 16 определений или 5.2 мл воды к флакону на 50 определений. Плавное перемешивают в течение 30 секунд. Не встряхивайте содержимое во избежание вспенивания.

В. Разведенный лизат может храниться в течение 24 часов при температуре +2+8°C без потери чувствительности. Разведенный лизат может быть разделен на несколько аликвот более удобного объема и храниться при температуре ниже -10° С в течение 4-х недель. Замороженный реактив следует размораживать непосредственно перед использованием. Замораживать и размораживать ЛАЛ-реактив можно только один раз.

2. Приготовление контрольного стандарта эндотоксина E.coli.

**ВНИМАНИЕ: для приготовления разведений эндотоксина не рекомендуется использовать пластиковые пробирки.**

А. Растворяют контрольный стандарт эндотоксина 5 мл воды для ЛАЛ-теста.

В. Перемешивают содержимое флакона с эндотоксином на вихревой мешалке не менее 15 минут.

С. Разводят получившийся раствор КСЭ водой для ЛАЛ-теста до концентрации 1 ЕЭ/мл. Это достигается путем разведения исходного раствора эндотоксина в X раз, где X – это активность КСЭ в ЕЭ/мл, которая указана в сертификате анализа. Общая формула для

приготовления раствора эндотоксина с концентрацией 1 ЕЭ/мл: 0,1 мл исходного раствора стандарта эндотоксина смешивается с 0,1x(X-1) мл воды для ЛАЛ-теста.

Например: X=21 ЕЭ/мл.

0,1 мл исходного раствора эндотоксина смешивают с 0,1x(21-1) = 2,0 мл воды для ЛАЛ-теста. Полученный раствор перемешивают на вортексе в течение 60 секунд.

D. Используя раствор КСЭ с концентрацией 1ЕЭ/мл, готовят серию последовательных двукратных разведений стандарта эндотоксина, которая перекрывает значение чувствительности ЛАЛ-реактива как показано в следующем примере. Каждое разведение перемешивают на вихревой мешалке в течение 60 секунд перед приготовлением следующего разведения.

**Приготовление серии разведений контрольного стандарта  
эндотоксина для ЛАЛ-реактива с заявленной  
чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл**

Пробирка #	Объем воды	Объем раствора КСЭ, добавляемого к воде	Концентрация эндотоксина
1	1,0	1,0 мл из раствора 1,0 ЕЭ/мл	0,5 ЕЭ/мл
2	1,0	1,0 мл из пробирки 1	0,25 ЕЭ/мл
3	1,0	1,0 мл из пробирки 2	0,125 ЕЭ/мл
4	1,0	1,0 мл из пробирки 3	0,06 ЕЭ/мл
5	1,0	1,0 мл из пробирки 4	0,03 ЕЭ/мл

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Каждый анализ должен включать:

- серию последовательных двукратных разведений КСЭ, которая перекрывает значение чувствительности ЛАЛ-реактива. При этом минимальная концентрация КСЭ должна быть ниже, а максимальная концентрация КСЭ выше значения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива;
- разведения испытуемого образца;
- воду для ЛАЛ-теста, служащую отрицательным контролем.

Избегая микробной или эндотоксиновой контаминации, аккуратно переносят по 0,10 мл каждого из растворов контрольного стандарта, испытуемого образца и воды для ЛАЛ-теста в соответствующие пробирки для проведения реакции (10x75 мм).

Затем добавляют в каждую пробирку по 0,10 мл разведенного ЛАЛ-реактива, начиная с пробирок с отрицательным контролем и затем переходя от пробирок с низкой концентрацией эндотоксина к пробиркам с более высокой концентрацией эндотоксина. Сразу после добавления ЛАЛ-реактива во все пробирки тщательно перемешивают их содержимое и помещают пробирки в термостат или водяную баню с отключенной функцией циркуляции при температуре 37°C±1°C. Данная процедура должна быть выполнена для каждого разведения эндотоксина. Неизвестный образец должен проверяться в параллели с растворами КСЭ. Анализ может быть проведен как качественный анализ, дающий ответ да/нет в одном разведении препарата или как количественный анализ, проводимый для серии разведений препарата. Время инкубирования определяется для каждой пробирки с момента помещения ее в водяную баню либо термоблок при температуре 37°C±1°C. Пробирки нельзя вынимать из термостата или водяной бани и двигать ранее положенного времени. Через 60 минут (±2 мин) инкубирования аккуратно извлекают пробирки из термоблока или водяной бани и переворачивают каждую пробирку на 180°.

1. Положительная реакция характеризуется образованием плотного геля, который не разрушается при аккуратном переворачивании пробирки на 180°.
2. Отрицательная реакция характеризуется отсутствием плотного геля после переворачивания пробирки. Образование помутнения или слабого геля, разрушающегося при переворачивании пробирки, оценивают как отрицательный результат.
3. По каждой пробирке результаты должны быть записаны в колонки как положительные либо отрицательные.

## ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЗАЯВЛЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

На этикетке каждого флакона ЛАЛ-реактива указана чувствительность, определенная с помощью национального стандарта эндотоксина, выраженная в единицах эндотоксина (ЕЭ).

В качестве валидации на рабочем месте каждый пользователь должен подтвердить заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива, используя контрольный стандарт эндотоксина, активность которого известна.

Готовят серию последовательных двукратных разведений стандарта эндотоксина так, чтобы минимальная концентрация КСЭ была ниже, а максимальная концентрация КСЭ была выше значения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. Каждый раствор этой серии, так же как и отрицательный контроль, представленный водой для ЛАЛ-теста, испытывается в четырехкратной повторности. После одного часа инкубирования результаты регистрируются как положительные или отрицательные. Конечной точкой реакции для каждой повторности является положительный результат, полученный для наименьшей концентрации эндотоксина в этой повторности.

### Результаты анализа – гель-тромб тест

Указанная чувствительность = 0,125 ЕЭ/мл

Разведения эндотоксина (ЕЭ/мл)							
Повторность	0,50	0,25	0,125	0,06	0,03	H <sub>2</sub> O	Конечная точка
1	+	+	+	-	-	-	0,125
2	+	+	+	-	-	-	0,125
3	+	+	+	+	-	-	0,06
4	+	+	+	-	-	-	0,125

Чувствительность лизата рассчитывается как среднее геометрическое конечных концентраций эндотоксина. Определяется значение десятичного логарифма для каждой повторности. Индивидуальные значения десятичных логарифмов усредняются, значение чувствительности лизата представляет собой антилогарифм среднего значения десятичных логарифмов результатов, полученных для каждой из повторностей.

## Расчет среднего геометрического значения конечных концентраций эндотоксина.

Конечная точка реакции (ЕЭ/мл)	Log <sub>10</sub> конечной точки реакции
0,125	-0,903
0,125	-0,903
0,06	-1,222
0,125	-0,903

Среднее геометрическое = -0,983

Antilog<sub>10</sub> среднего геометрического = 0,10  
ЕЭ/мл

Приемлемым отклонением считается значение, полученное в интервале от вдвое меньшего до вдвое большего значения от заявленной чувствительности лизата.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНДОТОКСИНА В НЕИЗВЕСТНОМ ОБРАЗЦЕ

Для определения концентрации эндотоксинов в неизвестном растворе его проверяют в серии последовательных двукратных разведений, продолжая их до тех пор, пока не будет получена конечная точка реакции. После этого рассчитывают среднее геометрическое значение разведений, соответствующих конечной точке реакции для каждой повторности. Полученное среднее значение необходимо умножить на чувствительность ЛАЛ-реактива.

### Определение содержания эндотоксина в неизвестном образце

Чувствительность ЛАЛ-реактива = 0,125 ЕЭ/мл

Разведения образца						
Повторности	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-

Конечная точка реакции (ЕЭ/мл)	Log <sub>10</sub> конечной точки реакции
1/8 (0,125)	-0,903
1/16 (0,0625)	-1,204

Среднее геометрическое значение = - 1,054

Antilog<sub>10</sub> среднего геометрического значения =  
0,088 = 1/11,4

Концентрация эндотоксина = Заявленная чувствительность лизата x  
среднее геометрическое значение степени разведения конечной точки реакции  
= 0,125 ЕЭ/мл x 11,4 = 1,4 ЕЭ/мл.

## ИНГИБИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ СО СТОРОНЫ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА

Реакция ЛАЛ-реактива с эндотоксином является ферментативной, и, таким образом, требует поддержания значения рН в оптимальных рамках, присутствия в растворе определенных солей и двухвалентных катионов. Испытуемый образец может изменять эти оптимальные условия в такой степени, что лизат может стать нечувствительным к эндотоксинам. Отрицательные результаты, полученные для испытуемых образцов, которые способны ингибировать ЛАЛ-тест, не обязательно свидетельствуют об отсутствии эндотоксина.

Поэтому каждый испытуемый образец должен сначала проверяться на возможность ингибирования реакции. Готовят серию последовательных двукратных разведений



стандарта эндотоксина на воде для ЛАЛ-теста и аналогичную серию разведений эндотоксина, в которой в качестве растворителя используют испытуемый образец. Исследуют каждую серию параллельно согласно стандартной процедуре проведения анализа. В конце периода инкубирования регистрируют положительные и отрицательные результаты и рассчитывают среднее геометрическое значение для обеих серий разведений эндотоксина. Испытуемый образец не ингибирует реакцию, если среднее геометрическое значение, полученное для серии разведений стандарта эндотоксина, приготовленных на испытуемом препарате, составляет от 1/2 до 2 раз от заявленной чувствительности лизата.

#### Проверка на ингибирование реакции

Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива = 0,125 ЕЭ/мл

Эндотоксин		Разведения эндотоксина (ЕЭ/мл)				
		0,50	0,25	0,125	0,06	0,03
<b>В воде</b>	1	+	+	+	-	-
	2	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-
	4	+	+	+	-	-
Среднее геометрическое значение конечной концентрации эндотоксина = 0,10 ЕЭ/мл						
<b>В препарате А</b>	1	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	-	-
Среднее геометрическое значение конечной концентрации эндотоксина = 0,15 ЕЭ/мл (Образец А не ингибирует реакцию)						
<b>В препарате В</b>	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-
Среднее геометрическое значение конечной концентрации эндотоксина = 0,50 ЕЭ/мл (Образец В ингибирует реакцию)						

Простейший способ преодолеть ингибирование препарата – его разведение. Следует принимать во внимание степень разведения препарата при расчете концентрации эндотоксина в испытуемом образце. Для быстрого определения степени разведения, при котором снимается ингибирующее действие испытуемого образца, готовят серию последовательных разведений, к каждому из которых добавляют КСЭ в концентрации, вдвое большей заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. Исследуют полученную серию разведений согласно стандартной процедуре проведения анализа. Положительные результаты указывают, при каком разведении преодолевается ингибирование. В случае выраженных кислотных или щелочных свойств испытуемого образца одновременно с разведением для преодоления эффекта ингибирования может потребоваться и коррекция значения рН.

#### 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. 98:325–351 (1956).
2. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337 (1964).
3. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265–274 (1964).
4. Levin, J. and F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thrombos. Diath. Haemorrh. 19:186–197 (1968).
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. Thrombos. Diath. Haemorrh. 23:170–181 (1970).
6. Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. Throm. Res. 2:55–70 (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. 51:1790–1797 (1972).
8. Nachum, R., A. Lipsey and S.E. Siegel. N. Eng. J. Med. 289:931–934 (1973).
9. Cooper, J.F., H.D. Hochstein and E.B. Seligman, Jr. Bull. Parent. Drug Assoc. 26:153–162 (1972).
10. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test. United States Pharmacopeia (USP).
11. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. European Pharmacopoeia (EP).
12. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. Japanese Pharmacopoeia (JP).
13. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, "Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers" (June 2012).

