

Pharma&Biotech

Lonza



**ИНСТРУКЦИЯ
к наборам реактивов PyroGene
Recombinant Factor C
(50-658NV, 50-658U)**

Применение

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.

В основе анализа с реактивом PyroGene лежит использование рекомбинантного фактора С (rFC), белка, чувствительного к эндотоксину. rFC используется в комбинации с флуорогенным субстратом, флуоресцентным микропланшетным ридером и соответствующим программным обеспечением для измерения эндотоксинов. Минимальный предел обнаружения эндотоксинов составляет 0,005 ЕЭ/мл, эндотоксины могут быть измерены в диапазоне концентраций от 0,005 до 5,0 ЕЭ/мл.

Предупреждение

Использовать только для *in Vitro* диагностики. Реактив PyroGene не предназначен для обнаружения эндотоксемии у человека или животных или для использования в клинической диагностике, лечения пациентов или квалификации крови или препаратов крови.

Безопасность

Токсикологические свойства реактивов не проверялись. Эти реактивы не считаются опасными в соответствии с OSHA Hazard Communication Standard 29 CFR 1910.1200. Рекомендуется следовать руководству NIH для опытов с рекомбинантной ДНК и общим предосторожностям при выполнении стандартных лабораторных работ.

Принцип

Введение Грам-отрицательных бактерий в кровяное русло мечехвостов *Limulus Polyphemus* вызывает внутрисосудистое свертывание крови и гибель животного (1). На молекулярном уровне было показано, что эндотоксин активирует каталитический свертывающий каскад сериновых протеаз, результатом чего является гелирование крови мечехвоста. Этот каскад используется в ЛАЛ-реактиве (LAL) (1,2,3,4) – методе определения бактериальных эндотоксинов.

Каскад сериновых протеаз и обоснование традиционного ЛАЛ-теста показано в ЛАЛ-пути на рисунке 1. Фактор С, первый компонент в каскаде, - это зимогеновая протеаза, которая активируется путем связывания с эндотоксином (5,6,7). В этом пути фактор В (FB) активируется фактором С. По альтернативному пути фактор G (FG) может быть активирован связыванием с глюканами (8). Далее пути фактора С и фактора G независимо активируют просвертывающий фермент, который переходит в активную форму – свертывающий фермент. В хромогенном ЛАЛ-тесте (реактив Kinetic-QCL производства Лонза) используется синтетический хромогенный белковый субстрат, который разрезается свертывающим ферментом, в результате чего в растворе развивается желтое окрашивание. В турбидиметрическом анализе (реактив PYROGENT-5000 производства Лонза) используется природный субстрат, коагулоген, который разрезается с образованием коагулин-геля. Коагулин-гель начинает самоассоциироваться в гелевые массы, в результате чего в растворе развивается помутнение. Значения оптической плотности при развитии желтого окрашивания (при длине волны 405 нм) или помутнения (при длине волны 340 нм) коррелируют с концентрацией эндотоксинов в растворе.

Исследования показали, что фактор С способен селективно распознавать эндотоксин и активировать каскад протеаз. Для создания эндотоксин-специфичного анализа фактор С был очищен и клонирован (5,6,7,9,10,11). При активации связыванием с эндотоксинами рекомбинантный фактор С действует на флуорогенный субстрат, находящийся в реакционной смеси, при этом выделяется флуоресцентный сигнал пропорционально концентрации эндотоксина в образце.

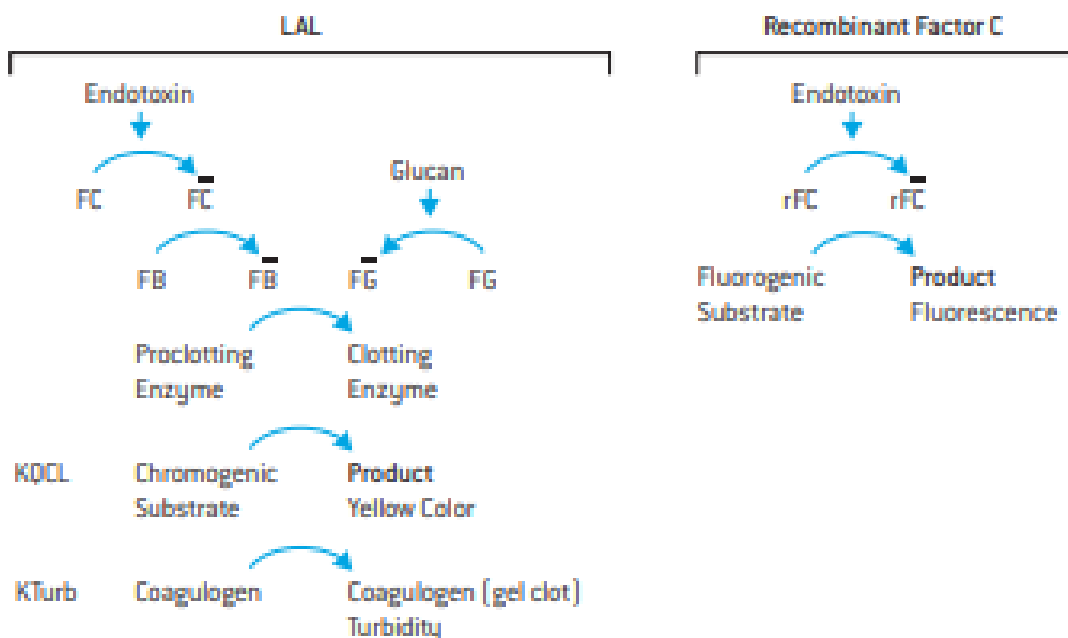


Рисунок 1. Схематическое изображение механизма определения эндотоксинов в ЛАЛ-системе и в rFC системе.

Принципы реакции

Рекомбинантный фактор С активируется, связываясь с эндотоксинами, при этом образуется активный центр, который разрезает синтетический субстрат, в результате чего генерируется флуорогенная частица (см. рисунок 1, путь rFC). Анализ проводится в 96-ти луночном планшете. Флуоресценция измеряется во время, равное 0, и после инкубирования в течение одного часа при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ во флуоресцентном микропланшетном ридере, используя длину волны возбуждения/испускания 380/440 нм. Разница между результатами измерения через час и в нулевое время (ΔRFU) скорректирована для ΔRFU флуоресценции для отрицательного контроля. Логарифмическая связка флуоресценции пропорциональна логарифму концентрации эндотоксина и является линейной в диапазоне измерений от 0,005 до 5,0 ЕЭ/мл. Содержание эндотоксина в образце рассчитывается по стандартной кривой.

Условия хранения

1. Набор PyroGene, каталожные номера 50-658U, 50-658NV хранится при температуре $2 - 8^{\circ}\text{C}$.

Поставляемые реактивы и конфигурации набора

Каталожный номер 50-658U включает:

1. 2 флакона с раствором рекомбинантного фактора С (rFC) , R50-658, 1.2 мл/флакон

2. 2 флакона флуорогенного субстрата, S50-658, 6.0 мл/флакон
3. 2 флакона буфера, B50-658, 5.0 мл/флакон
4. 2 флакона контрольного стандарта эндотоксина E.coli, O55:B5, E50-643, лиофилизированного.
Объем воды для ЛАЛ-теста, требуемый для его разведения, указан в сертификате анализа и рассчитан таким образом, чтобы исходный раствор эндотоксина имел концентрацию 20 ЕЭ/мл. Разведенный эндотоксин стабилен в течение 4 недель при температуре 2 - 8°C.
5. 2 флакона воды для ЛАЛ-теста, W50-640, 30 мл/флакон. Вода используется для растворения контрольного стандарта эндотоксина и разведения образцов. Вода для ЛАЛ-теста является эквивалентом воды для теста на бактериальные эндотоксины (BET).

Каталожный номер 50-658NV включает:

6. 30 флаконов с раствором рекомбинантного фактора С (rFC) , R50-658, 1.2 мл/флакон
7. 30 флаконов флуорогенного субстрата, S50-658, 6.0 мл/флакон
8. 30 флаконов буфера, B50-658, 5.0 мл/флакон
9. 10 флаконов контрольного стандарта эндотоксина E.coli, O55:B5, E50-643, лиофилизированного.
Объем воды для ЛАЛ-теста, требуемый для его разведения, указан в сертификате анализа и рассчитан таким образом, чтобы исходный раствор эндотоксина имел концентрацию 20 ЕЭ/мл. Разведенный эндотоксин стабилен в течение 4 недель при температуре 2 - 8°C.
Сертификаты анализа доступны на сайте www.lonza.com/coa.

Материалы и оборудование, закупаемые отдельно

1. Одноразовые апиrogenные пробирки для разведения (13 x 100 мм, каталожный номер N207 или эквивалент).
2. Индивидуально упакованные стерильные пипетки.
3. Автоматические дозаторы со стерильными наконечниками, индивидуально упакованными или в штативах.
4. Одноразовые стерильные планшеты. Внимание: перед использованием в рутинных анализах микропланшеты должны быть пре-квалифицированы (каталожный номер 25-340 или эквивалент).
5. Резервуар для реагентов (каталожный номер 00190035 или эквивалент)
6. Восьмиканальный дозатор
7. Флуоресцентный микропланшетный ридер (каталожный номер 25-344, FLx 800 TBIЕ ридер с Ex 380/20 и Em 440/30 или эквивалент).
8. Программное обеспечение (WinKQCL V4.0.2 или выше, рекомендовано).
9. Таймер.
10. Вортекс.
11. Для набора 50-658NV вода для ЛАЛ-теста (W50-640 или эквивалент). Вода для ЛАЛ-теста является эквивалентом воды для теста на бактериальные эндотоксины (BET).

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 pH испытуемого образца до значений 6,0-8,0, можно использовать апиrogenные растворы гидроксида натрия или соляной кислоты. Всегда следует измерять значение pH аликвоты испытуемых образцов, чтобы избежать контаминации испытуемого раствора pH-электродом. Не следует доводить значение pH 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 °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.

Установка чувствительности для флуоресцентного ридера

Обычно флуоресцентные сигналы записываются в относительных флуоресцентных единицах (RFU). Так как настоящий флуоресцентный сигнал конвертируется в электронный сигнал, который может быть «настроен», используя настройки усиления или настройки чувствительности, RFU – это арбитражная единица. В зависимости от силы определяемого сигнала, прибор может быть настроен на высокую чувствительность, чтобы поддерживать слабый сигнал, или на низкую чувствительность, когда сигнал слишком сильный. Рекомендуется обратиться к Руководству пользователя на прибор для объяснений производителя.

В анализе с рекомбинантным фактором C 3-log диапазон концентраций эндотоксина соответствует 3-log диапазону в RFU. Если настроена слишком низкая чувствительность, будет трудно обнаружить флуоресцентный сигнал для самого низкого стандарта, если настроена слишком высокая чувствительность, то флуоресцентный сигнал для самого высокого стандарта будет за пределами шкалы обнаружения. Перед проведением любого анализа важно определить соответствующую чувствительность для анализа с рекомбинантным фактором C. Например, ридер FLx800 имеет флуоресцентный диапазон от 0 до 99,999. Чтобы установить 3-log диапазон для стандартной кривой, был выбран RFU диапазон от 1,000 до 10,000 для стандарта 0,5 ЕЭ/мл. Диапазон RFU от 1,000 до 10,000 соответствует log диапазону от 3 до 4, с серединой, равной 3,5. Таким образом, абсолютная цель RFU для стандарта 0,5 ЕЭ/мл приблизительно равняется 3,000 RFU. Для того, чтобы сохранить адекватное разделение между отрицательным контролем и самым низким стандартом в рутинных анализах, это значение должно считаться минимумом в желаемом диапазоне. При использовании альтернативных ридеров следует обратиться к соответствующим руководствам пользователя.

Определение соответствующей установки чувствительности

Внимание: данная процедура может быть проведена как часть валидационного процесса (Performance qualification) для каждой новой серии реактивов, после крупного ремонта оборудования (такого как замена лампы) или в ситуации, когда эксплуатационные характеристики ридера вызывают сомнения. Рекомендуется периодическая рекалибровка как часть любой программы по обслуживанию оборудования.

1. Подготовьте раствор контрольного стандарта эндотоксина с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл (см. Приготовление стандартов эндотоксина). Перед смешиванием дайте реактивам нагреться до комнатной температуры.
2. Обратитесь к Руководству пользователя программы WinKQCL или к подсказкам для выполнения теста на чувствительность.
3. Введите соответствующую информацию в поля для заполнения и подтвердите установки для анализа. Ниже приведен пример для ридера FLx800.

| | |
|-----------------------------------|------------------------|
| Endotoxin Concentration Unitage | EU |
| Time between reads (hh:mm:ss) | 01:00:00 |
| Excitation filter (nm) | 380:20 |
| Emission filter (nm) | 440:30 |
| Scans per well | 4 |
| Delay before scanning (millisec.) | 150 |
| Delay between scans (millisec.) | 1 |
| Optics position | bottom |
| Wells to use: Pre-defined | {D6,7; E6,7; F6,7} |
| Sensitivity (select by checking) | 30, 35, 40, 45, 50, 55 |

4. Добавьте по 100 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл в лунки D6,7; E6,7; F6,7.
5. Преинкубируйте закрытый планшет со стандартами при температуре 37°C ± 1°C в течение 10 минут.
6. Приготовьте рабочий реактив путем смешивания флуорогенного субстрата, буфера для рекомбинантного фактора С и раствора рекомбинантного фактора С в соотношении 5:4:1. 500 мкл + 400 мкл + 100 мкл – достаточное количество для теста на чувствительность. После открытия неиспользованные реактивы следует убрать в холодильник. Предварительно открытые флаконы, если они хранятся в холодильнике, остаются действующими в течение времени хранения разведенного стандарта эндотоксина. Получение приемлемых критериев анализа будет указывать на использование годных реактивов. **Внимание:** порядок смешивания должен оставаться последовательным. Добавляйте рекомбинантный фактор С последним к забуференному субстрату. Перемешайте тщательно, но осторожно.

Не перемешивайте рабочий реактив на вортексе. **Внимание:** приготовленный рабочий реактив не хранится.

7. Следуя подсказкам программы, добавьте по 100 мкл рабочего реактива во все лунки, содержащие образцы эндотоксина. Следуйте подсказкам на экране, чтобы начать тест. **Внимание:** оставьте планшет открытым на время проведения анализа.
8. После завершения анализа на экране отобразится итоговый отчет с рассчитанным значением чувствительности. Используя линейную регрессию, значение чувствительности, скоррелированное до $\log \Delta RFU$, округляется до ближайшего целого значения. При использовании данных настроек должны быть получены удовлетворительные результаты.

Внимание: Если прогнозируемое значение чувствительности оказалось вне диапазона параметров 30, 35, 40, 45, 50 и 55, тогда анализ по определению чувствительности должен быть повторен, используя более подходящий диапазон, в который будут включены результаты анализа. Не рекомендуется экстраполировать результаты за пределами диапазона калибровочной кривой.

Определенная установка чувствительности: _____

Для набора с номером серии: _____

Подготовка стандартов эндотоксина

Для расчета концентрации эндотоксинов в неизвестных образцах каждый анализ с реактивом PyroGene должен сопровождаться валидированной стандартной калибровочной кривой.

Поскольку значение содержания эндотоксинов может лежать в большом диапазоне концентраций, можно приспособить диапазон определения концентрации эндотоксинов каждого конкретного анализа путем построения калибровочной кривой в определенном диапазоне концентраций. Для построения калибровочной кривой требуется минимум три стандарта.

Анализ с реактивом PyroGene был оптимизирован таким образом, чтобы быть линейным в диапазоне концентраций от 0,005 ЕЭ/мл до 5,0 ЕЭ/мл. Однако, индивидуальный пользователь может сократить диапазон, охватываемый калибровочной кривой, в зависимости от требований к конкретному препарату.

Для удобства пользователей в набор включен эндотоксин E. coli 055:B5. Можно использовать и другие стандарты эндотоксина, однако, их использование в анализе с реактивом PyroGene должно быть определено по отношению к настоящему национальному стандарту эндотоксина (RSE).

Поставляемый лиофилизированный контрольный стандарт эндотоксина E. coli 055:B5 разводится водой для ЛАЛ-теста, при этом полученный исходный раствор имеет концентрацию 20 ЕЭ/мл. Объем воды для ЛАЛ-теста, необходимый для разведения контрольного стандарта, указан в сертификате анализа и рассчитан таким образом, чтобы полученный раствор имел концентрацию 20 ЕЭ/мл. Разведите контрольный стандарт указанным объемом воды для ЛАЛ-теста. Интенсивно перемешайте на вортексе

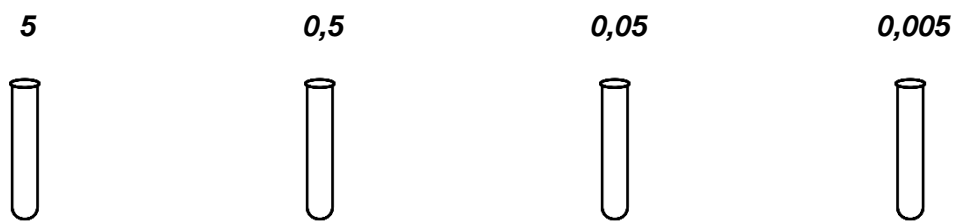
на высоких оборотах приблизительно в течение 15 минут. Перед каждым последующим использованием раствор должен быть нагрет до комнатной температуры и интенсивно перемешан около 15 минут.

В таблице ниже приведена схема разведений для построения серии разведений эндотоксина, поставляемого в наборе.

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

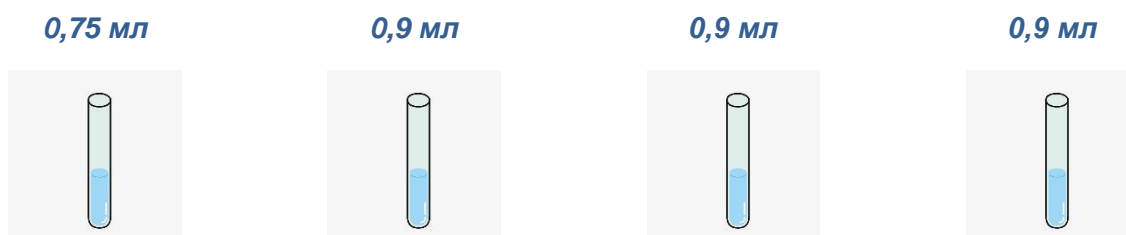
| Концентрация эндотоксина, ЕЭ/мл | Объем воды для ЛАЛ-теста, мл | Объем раствора эндотоксина, добавляемого к воде для ЛАЛ-теста |
|---------------------------------|------------------------------|---|
| 5,0 | 0,75 | 0,25 мл раствора 20 ЕЭ/мл |
| 0,5 | 0,9 | 0,1 мл раствора 5,0 ЕЭ/мл |
| 0,05 | 0,9 | 0,1 мл раствора 0,5 ЕЭ/мл |
| 0,005 | 0,9 | 0,1 мл раствора 0,05 ЕЭ/мл |

Пробирки для приготовления серии разведений КСЭ подписывают следующим образом:



В пробирку 5 вносят по 0,75 мл воды для ЛАЛ-теста.

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



1. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **5 ЕЭ/мл** в пробирку **#5** вносят 0,25 мл исходного раствора КСЭ с концентрацией 20 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.
2. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **0,5 ЕЭ/мл** в пробирку **#0,5** вносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 5 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.

3. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **0,05 ЕЭ/мл** в пробирку **#0,05** вносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.
4. Для приготовления раствора КСЭ с концентрацией **0,005 ЕЭ/мл** в пробирку **#0,005** вносят 0,1 мл раствора КСЭ с концентрацией 0,05 ЕЭ/мл. Полученный раствор интенсивно перемешивают на вортексе не менее 1 минуты.

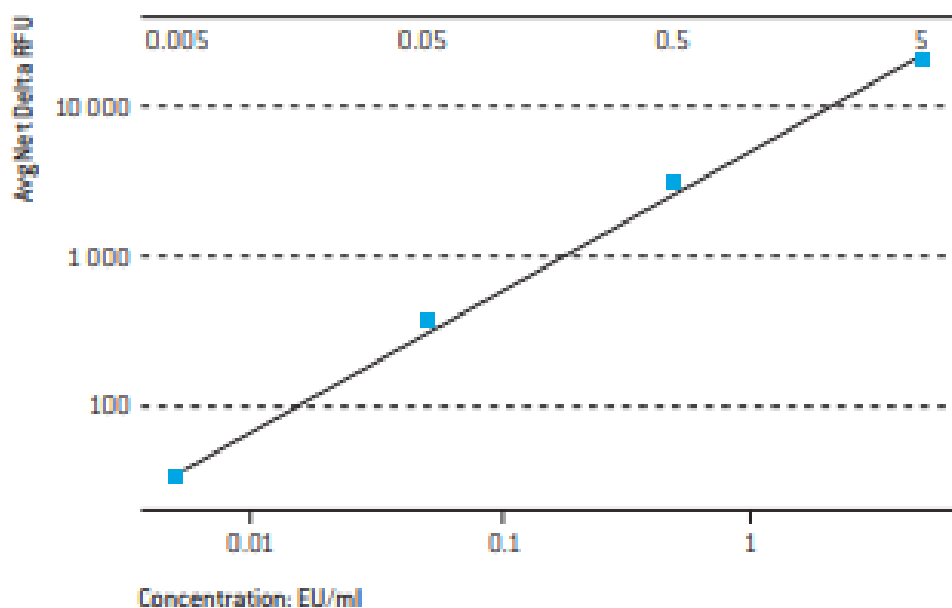
Процедура анализа

Следует дать реактивам нагреться до комнатной температуры перед использованием.

Общая процедура анализа

1. Анализ с использованием PyroGene проводится в 96-ти луночном планшете. Добавьте по 100 мкл воды для ЛАЛ-теста, стандартов эндотоксина и испытуемых образцов в соответствующие лунки планшета. Обычно растворы проверяются в двух или трех повторностях.
2. Чтобы приготовить положительный контроль испытуемого препарата (спайк), выберите концентрацию эндотоксинов в спайке в зависимости от возможного исходного содержания эндотоксинов в испытуемом образце или его разведении. Для приготовления спайка с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл добавьте 10 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 5,0 ЕЭ/мл в лунки, обозначенные как положительный контроль испытуемого препарата (PPC).
3. Преинкубируйте планшет в ридере при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение как минимум 10 минут.
4. Во время периода преинкубирования подготовьте рабочий реактив, состоящий из флуорогенного субстрата, буфера и раствора рекомбинантного фактора С в соответствующем соотношении 5:4:1.
5. Аккуратно внесите по 100 мкл рабочего реактива в каждую лунку.
6. Проведите измерение флуоресценции при времени, равном 0.
7. Инкубируйте реакционные смеси в течение часа и затем по истечении одного часа проведите измерение флуоресценции.
8. Разница в полученных значениях между измерением в нулевое время и после часа инкубирования скорректирована отрицательным контролем.
9. Строится график зависимости $\log \text{net } \Delta\text{RFU}$ от концентрации эндотоксина в линейной регрессии – как показано в примере ниже.

Endotoxin standard curve in the PyroGene™ Assay



10. Рассчитайте концентрацию эндотоксинов в образцах по стандартной кривой.

Использование ридера FLx800 и программного обеспечения WinKQCL

В данном анализе могут быть использованы ридер FLx800 и программное обеспечение WinKQCL.

1. Включите ридер и загрузите программу. Создайте в программе новый планшет для анализа с использованием реактива PyroGene. В программу могут быть внесены несколько видов анализа. Обратитесь к Руководству пользователя за дополнительной информацией. Сохраните новый планшет.
2. Можно запустить анализ, выбрав кнопку «Run» из окна планшета. Обратитесь к Руководству пользователя или к разделу «Help» за дополнительной информацией.
3. Поместите в ридер планшет (заполненный отрицательным контролем, стандартами и образцами) и преинкубируйте его минимум 10 минут при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
4. Во время 10-ти минутной инкубации подготовьте рабочий реактив, смешав флуорогенный субстрат, буфер и рекомбинантный фактор С в соотношении 5:4:1 соответственно. Для того, чтобы убедиться, что количество рабочего реактива достаточно для анализа, а излишки минимальны, определите количество лунок, для которых требуется реактив, добавьте 4 дополнительные лунки и рассчитайте соответствующее количество каждого компонента для приготовления рабочего реактива. Перед смешиванием дайте реактивам нагреться до комнатной температуры. Порядок смешивания должен оставаться постоянным. Добавьте рекомбинантный фактор С в последнюю очередь к забуференному субстрату. Перемешайте осторожно, но тщательно. Не перемешивайте на вихре.

Смотрите таблицу ниже. **Внимание:** приготовленный реактив не подлежит хранению.

Объем реактивов (в мкл), требуемых на общее число лунок

Чтобы быть уверенным в том, что реактива точно хватит, рассчитывайте количество реактива, исходя из количества лунок в анализе плюс четыре дополнительные лунки.

| Количество лунок | Флуорогенный субстрат | Буфер | Рекомбинантный фактор С | Общий объем |
|-------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------------|
| 6 | 500 | 400 | 100 | 1000 |
| 12 | 800 | 640 | 160 | 1600 |
| 24 | 1400 | 1120 | 280 | 2800 |
| 36 | 2000 | 1600 | 400 | 4000 |
| 42 | 2300 | 1840 | 460 | 4600 |
| 48 | 2600 | 2080 | 520 | 5200 |
| 54 | 2900 | 2320 | 580 | 5800 |
| 60 | 3200 | 2560 | 640 | 6400 |
| 66 | 3500 | 2800 | 700 | 7000 |
| 72 | 3800 | 3040 | 760 | 7600 |
| 78 | 4100 | 3280 | 820 | 8200 |
| 84 | 4400 | 3520 | 880 | 8800 |
| 90 | 4700 | 3760 | 940 | 9400 |
| 96 | 5000 | 4000 | 1000 | 10000 |

5. Следуя подсказкам программы по истечении времени преинкубирования, с помощью восьмиканального дозатора внесите по 100 мкл рабочего реактива в соответствующие лунки.
6. Сразу же следуйте подсказкам программы, отображающимся на экране. Программное обеспечение начнет первое инкубирование (при нулевом времени), за которым потом последует второе инкубирование через один час.
7. После завершения анализа данные автоматически сохраняются на жестком диске.

Виды анализа с использованием реактива PyroGene

Интегральной частью комплекса для проведения анализа с использованием реактива PyroGene являются флуоресцентный 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 реактива PyroGene можно проводить четыре основных типа анализов, каждый из которых предназначен для выполнения различных аспектов проверки препаратов в тесте на содержание эндотоксинов.

1. Рутинные анализы

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

В качестве части рутинного анализа пользователь имеет возможность включить положительный контроль испытуемого препарата (Positive Product Control, PPC) для определения возможности ингибирования/усиления реакции. 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 реактива PyroGene с эндотоксином является ферментативной, поэтому она протекает при определенном значении pH и при определенной концентрации солей и дивалентных катионов в растворе. Испытуемые препараты могут изменять оптимальные условия проведения реакции в такой степени, что рекомбинантный фактор С 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/мл или ЕЭ/нг. Пользователь также имеет возможность выбрать другие единицы выражения активности, отличные от ЕЭ или нг.

4. Начальная квалификация

Анализ по начальной квалификации разработан в соответствии с требованиями USP главы 85 «Тест на бактериальные эндотоксины» (12). Этот анализ является частью валидации ЛАЛ-теста и должен проводиться для каждой новой серии набора реактивов. Анализ с использованием реактива PyroGene имеет в своей основе ЛАЛ-тест, поэтому Лонза предлагает использовать похожий подход.

В анализе по начальной квалификации рассчитывается \log/\log линейная корреляция значений индивидуальной $\text{net } \Delta\text{RFU}$ для каждой повторности стандарта эндотоксина. В других видах анализа используется среднее $\text{net } \Delta\text{RFU}$ для всех повторностей для каждой концентрации стандарта эндотоксина.

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

Критерии анализа

Линейность*

Должна соблюдаться линейность стандартной кривой, построенной в диапазоне различных концентраций эндотоксина. В анализе должно быть использовано не менее 3 концентраций стандарта эндотоксина, охватывающих исследуемый диапазон концентраций, а также отрицательный контроль с водой для ЛАЛ-теста. 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.

Значение коэффициента корреляции (r) для рассчитанной калибровочной кривой должно быть ≥ 0.980 .

*Рассмотрение дополнительных данных смотрите в других технических разделах.

Ингибирование

Ингибирование реакции возникает в том случае, если вещества, присутствующие в испытуемом препарате, мешают протеканию ферментативной реакции. Ингибирование проявляется в удлинении финальной ΔRFU , 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 концентрация эндотоксина в спайке была выбрана, исходя из возможного ожидаемого содержания эндотоксинов в образце или его разведении. Положительный контроль испытуемого препарата анализируется вместе с самим испытуемым препаратом, и автоматически высчитывается относительное содержание эндотоксинов в образце. Полученное значение определенной концентрации эндотоксина в положительном контроле должно равняться известному значению добавленного эндотоксина в пределах определения 50 - 200% (12).

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

Пробирочный метод

Добавьте 0,5 мл раствора эндотоксина с концентрацией 5,0 ЕЭ/мл к 4,50 мл испытуемого образца (или его разведения). Данный раствор содержит эндотоксин в концентрации 0,5 ЕЭ/мл. Перед использованием интенсивно перемешайте полученный раствор на вортексе в течение одной минуты.

Планшетный метод #1

Перенесите по 10 мкл раствора эндотоксина с концентрацией 5,0 ЕЭ/мл в каждую лунку 96-ти луночного планшета с положительным контролем испытуемого препарата в соответствии с картой планшета. Добавьте в эти лунки по 100 мкл испытуемого образца (или его разведения). В каждой лунке теперь содержится раствор с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл эндотоксина. Осторожно перемешайте.

Планшетный метод #2

Перенесите по 100 мкл 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 5,0 ЕЭ/мл. В каждой лунке теперь содержится раствор с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл эндотоксина. Осторожно перемешайте.

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

Определение неингибирующего разведения со спайком с концентрацией 0,5 ЕЭ/мл

| Фактор разведения препарата | Определенная концентрация эндотоксина в растворе (ЕЭ/мл) | | | Воспроизводимость спайка | Ингибирование | Содержание эндотоксина (определенная концентрация x фактор разведения) |
|-----------------------------|--|------------|---------|--------------------------|----------------|--|
| | Без спайка | Со спайком | Разница | | | |
| 1/10 | 0,075 | 0,1 | 0,025 | 5% | Ингибирующая | Не определяется |
| 1/20 | 0,044 | 0,264 | 0,22 | 44% | Ингибирующая | Не определяется |
| 1/40 | 0,025 | 0,495 | 0,47 | 94% | Неингибирующая | 1,0 ЕЭ/мл |

Лонза советует 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.

Другие технические вопросы

Улучшение воспроизводимости спайка

Можно улучшить способ определения воспроизводимости спайка путем использования другой процедуры обработки данных (например, полиномиальная модель с использованием функции PowerCurve).

Преодоление ингибирования с помощью диспергирующего агента

Диспергирующий агент PYROSPERSE, каталожный номер N190, несовместим с анализом с использованием реактива PyroGene.

Литература

1. Levin, J. and F.B. Bang. The Role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115: 265 (1964).
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. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19: 186 (1968).
4. Iwanaga S. The Limulus clotting reaction. Curr. Opin. Immunol. 5: 74 (1993).
5. Nakamura T., Morita T., Iwanaga S. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes. Eur. J. Biochem. 154: 511 (1986).
6. Muta T., Miyata T., Misumi Y. et al. Limulus Factor C: an endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. J. Biol. Chem. 266: 6554 (1991).
7. Tokunaga F., Nakajima H., Iwanaga S. Further studies on lipopolysaccharidesensitive serine protease zymogen (factor C): its isolation from Limulus polyphemus hemocytes and identification as an intracellular zymogen activated by alpha-chymotrypsin, not by trypsin. J. Biochem. 109: 150 (1991).
8. Morita, T. et al. A new (1-3) beta-D glucan mediated coagulation pathway found in Limulus amebocytes. FEBS Letts. 129: 318 (1981).
9. Ding J.L., Navas M.A.A., Ho B. Two forms of Factor C from the amoebocytes of Carcinoscopus rotundicauda: purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta 1202: 149 (1993).
10. Ding J.L., Navas M.A.A., Ho B. Molecular cloning and sequence analysis of Factor C cDNA from the Singapore horseshoe crab, Carcinoscopus rotundicauda. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4: 90 (1995).
11. Ding J.L. and Ho B. New era in pyrogen testing. Trends in Biotechnology, 19: 277 (2001).
12. Chapter Bacterial Endotoxins Test. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.



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