

ЛАЛ-реактив PYROSTAR™ ES-F/Plate

Флакон на несколько определений (2.0 мл и 5.2 мл) в наборе с контрольным стандартом эндотоксина
Назначение: Limulus amoebocyte lysate (LAL) предназначен для определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. PYROSTAR™ ES-F/Plate предназначен для количественного определения эндотоксинов кинетическим турбидиметрическим методом. Диапазон количественного определения в кинетическом турбидиметрическом анализе (КТА) составляет:

Диапазон определения в КТА (ЕЭ/мл)
от 0.01 до 10

Каталожный номер: WPERK4-20015

Общая информация

Эндотоксины (липополисахариды или ЛПС) – это компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Так как попадание эндотоксинов в кровотоки через инъекцию или имплантацию может вызывать лихорадку и/или шок, определение бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах и изделиях медицинского назначения является критическим.

ЛАЛ-тест – это наиболее чувствительный метод определения бактериальных эндотоксинов, в настоящее время одобренный фармакопеей США (2). Первым методологическим подходом, который использовался для определения результатов анализа, было формирование геля на дне стеклянной реакционной пробирки. Также было замечено, что испытуемый раствор становится мутным перед формированием геля. Время, которое необходимо для образования определенного уровня помутнения обратно пропорционально количеству эндотоксинов в образце (1).

Для измерения скорости изменения мутности используется микропланшетный фотометр, (Tecan Sunrise или эквивалент). Данная процедура количественного измерения обычно известна как Кинетический Турбидиметрический Анализ (КТА).

Используя эти свойства, Wako Chemicals USA разработали ЛАЛ-реактив, который может быть использован для количественного турбидиметрического анализа.

В статье «Бактериальные эндотоксины» USP приведены стандартные процедуры для валидации перед рутинным использованием.

Однако, специфичность ЛАЛ-реактива не абсолютна (7). Было показано, что ЛАЛ-реактив реагирует не только с эндотоксинами, но также и с β -1,3-глюканами. Несмотря на то, что ферментативный каскад, активируемый β -1,3-глюканами, является отличным от такого, активируемого эндотоксинами (8), конечный результат - образование геля - не различается.

Активация ЛАЛ-реактива глюканами в образце может быть предотвращена путем добавления большого количества карбоксиметилированного курдлана (КМК) к ЛАЛ-реактиву. Присутствие большого количества глюканов не мешает определению эндотоксинов. Wako впервые использовали данное открытие, разработав эндотоксин-специфичный буфер, который содержит высокие концентрации КМК. Когда для разведения ЛАЛ-реактива используется эндотоксин-специфичный буфер, ЛАЛ-реактив становится эндотоксин-специфичным. PYROSTAR™ ES-F/Plate – это новый состав ЛАЛ-реактива, в котором карбоксиметилкурдлан лиофилизирован вместе с лизатом. При разведении реактива PYROSTAR™ ES-F/Plate водой для ЛАЛ-теста получается эндотоксин-специфичный ЛАЛ-реактив.

История и биологические принципы

Начало определения бактериальных эндотоксинов in-vitro было положено Левином и Бангом (3). Их наблюдения показали, что кровь мечехвостов, *Limulus Polyphemus*, сворачивается в присутствии

граммотрицательных бактерий. Позже они установили, что все компоненты, которые необходимы для формирования геля, могут быть изолированы из циркулирующих амебоцитов, обнаруженных в крови *Limulus* (3,4).

В 1987 (5) году Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (U.S. Food and Drug Administration, FDA) выпустило Руководство для производителей лекарственных препаратов, биологических продуктов, ветеринарных препаратов и изделий медицинского назначения, в котором оно информировало о процедурах, которые считает необходимыми для валидации использования ЛАЛ-теста в качестве теста готовой продукции на бактериальные эндотоксины. В 2000 году Руководство FDA было соединено с фармакопейной статьей USP «Бактериальные эндотоксины», что сделало метод, описанный в USP, стандартным методом для производителей в США. В 2011 году Руководство FDA 1987 года было отозвано.

Предупреждения и общие предосторожности

PYROSTAR™ ES-F/Plate предназначен для определения *in-vitro* бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий. При обращении с ЛАЛ-реактивом следует соблюдать осторожность, так как его токсичность неизвестна.

Данный тест не является диагностическим инструментом и не предназначен для определения уровня эндотоксинов у человека с целью диагностики.

Реактивы, входящие в поставку

ЛАЛ-реактив PYROSTAR™ ES-F/Plate: PYROSTAR™ ES-F/Plate – это лиофилизированный реактив, содержащий лизат амебоцитов *Limulus*, буфер, карбоксиметилкурдлан, одно- и двухвалентные катионы.

Приготовление: постучите флаконом о ровную поверхность для того, чтобы убедиться, что весь порошок собрался на дне флакона. Осторожно удалите пробку и добавьте во флакон 2 мл или 5,2 мл воды для ЛАЛ-теста. Закройте флакон пробкой и аккуратно покачайте флакон круговыми движениями, чтобы растворить содержимое, избегая контакта раствора с пробкой.

Хранение: храните ЛАЛ-реактив при температуре от 2 до 10°C. Разведенный реактив следует хранить в холодильнике при температуре 2-8°C максимально в течение 6-ти часов или при температуре -15±5°C максимально в течение 14 дней. Разведенный ЛАЛ-реактив может быть заморожен и разморожен только один раз.

Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ): лиофилизированный реактив, который содержит очищенный эндотоксин из *E. Coli* и используется для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива, валидации метода для препарата и приготовления контролей ингибирования.

Приготовление: погасите вакуум, осторожно приподняв и удалив резиновую пробку с флакона. Во флаконе содержится 500 нг эндотоксина. Каждая серия Контрольного Стандарта Эндотоксина тестируется в сравнении с Международным Стандартом Эндотоксина FDA (Reference Endotoxin Standard), при этом определяется активность контрольного стандарта в ЕЭ/нг. Значение содержания единиц эндотоксина (ЕЭ) во флаконе указано на этикетке флакона. Рассчитайте объем воды для ЛАЛ-теста, который необходимо добавить во флакон с КСЭ, чтобы получить раствор с концентрацией 1000 ЕЭ/мл. Добавьте во флакон рассчитанный объем воды для ЛАЛ-теста. Закройте флакон пробкой, переверните несколько раз и интенсивно перемешайте на вортексе в течение двух минут.

Хранение: Растворенный КСЭ можно хранить в холодильнике при температуре 2-10°C в течение одного месяца. КСЭ не должен храниться при температуре ниже 0°C. Перед использованием раствор следует интенсивно перемешать на вортексе в течение одной минуты.

Материалы и оборудование, не входящие в поставку

Международный стандарт эндотоксина (RSE): Международный стандарт эндотоксина USP, который имеет определенную активность 10 000 USP Единиц эндотоксина (EU).

Вода для ЛАЛ-теста (ВЕТ): вода, не содержащая эндотоксинов.

Наконечники, свободные от эндотоксинов

Пробирки для разведения, не содержащие эндотоксинов

Планшетный метод:

Микропланшетный ридер (Tecan Sunrise или эквивалент)

Планшеты, свободные от эндотоксинов (96-ти луночные плоскодонные планшеты Corning (каталожный номер 3370) или эквивалент).

Подготовка разведений контрольного стандарта эндотоксина

Приготовление контрольного стандарта эндотоксина

Основываясь на информации, представленной в Сертификате анализа, подготовьте раствор КСЭ с концентрацией 1000 ЕЭ/мл, как указано выше. Перемешайте раствор КСЭ с концентрацией 1000 ЕЭ/мл на вортексе при комнатной температуре. Используя раствор КСЭ с концентрацией 1000 ЕЭ/мл, приготовьте серию разведений эндотоксина, как показано в Таблице 1.

Перемешивайте каждую пробирку в течение 30 секунд между разведениями. Можно приготовить разведения других объемов, соблюдая то же соотношение объемов растворов.

Таблица 1

Схема разведений эндотоксина (серия десятикратных разведений)

Исходная концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)	Объемы растворов КСЭ и воды для ЛАЛ-теста (мл)	Конечная концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)
1000	0.4+3.6	100
100	0.4+3.6	10
10	0.4+3.6	1
1	0.4+3.6	0.1

0.1	0.4+3.6	0.01
-----	---------	------

Отбор и подготовка образцов

Реакция с ЛАЛ-реактивом чувствительна к значению pH, которое для смеси ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата должно быть в диапазоне 6.0 – 8.0. PYROSTAR™ ES-F/Plate содержит буфер, который в большинстве случаев помогает доведению значения pH до необходимого диапазона. Если доведение pH необходимо, следует использовать апиrogenные растворы HCl или NaOH для доведения pH испытуемого образца.

Факторы, мешающие реакции

Перед тем, как использовать ЛАЛ-тест в рутинном контроле качества выпускаемого препарата, необходимо валидировать отсутствие факторов, мешающих проведению реакции, с помощью проведения анализа на мешающие факторы для каждого препарата. Считается, что препарат не содержит мешающих факторов, если при добавлении к образцу известного количества эндотоксина будет определено от 50 до 200% от добавленного количества эндотоксина.

Кинетический турбидиметрический анализ (КТА): подготовьте стандартную кривую, которая покрывает диапазон исследуемых концентраций. Добавьте в положительный контроль препарата количество эндотоксина, равное или близкое середине калибровочной кривой. Считается, что препарат не ингибирует реакцию, если определенное в опыте значение эндотоксина составляет от 50 до 200% от добавленной концентрации эндотоксина. Например, если стандартная кривая охватывает диапазон от 0,1 до 10 ЕЭ/мл, в препарат должен быть добавлен эндотоксин в такой концентрации, чтобы конечное значение составляло 1,0 ЕЭ/мл. Приемлемое определенное значение эндотоксина составит от 0,5 до 2,0 ЕЭ/мл.

Процедура кинетического турбидиметрического анализа

Кинетический турбидиметрический анализ (КТА) может быть проведен на планшетном ридере и с помощью программного обеспечения (микропланшетный ридер Tecan Sunrise или эквивалент).

Кроме испытуемого препарата, достоверный анализ также должен включать стандартную калибровочную кривую для данного диапазона концентраций, положительный контроль препарата и отрицательный контроль. Все значения в анализе должны быть определены как минимум в двух повторностях.

Планшетный метод:

Все образцы, стандарты и реактивы должны быть прогреты до комнатной температуры, перед началом следующей процедуры:

Асептически перенесите по 0,05 мл (50 мкл) каждого образца или контроля в соответствующие лунки планшета, начиная с отрицательного контроля и заканчивая самой высокой концентрацией эндотоксина. Добавьте по 0,05 мл (50 мкл) ЛАЛ-реактива Pyrostar ES-F/Plate в каждую лунку планшета, содержащую образец или стандарт. Поместите планшет в микропланшетный ридер, установив следующие параметры в программе:

Длина волны: 405 нм

Пороговое значение оптической плотности: 0,015

Интервал между измерениями: 40 секунд

Температура: 37°C

По окончании периода инкубирования программное обеспечение выполнит анализ регрессии стандартной калибровочной кривой и рассчитает уровень содержания эндотоксинов в каждом образце.

Смотрите статью “Bacterial Endotoxins Test” в Американской Фармакопее и обратитесь к разделам, описывающим стандартную кривую и приготовление растворов (6).

Расчет концентрации эндотоксина

Во время кинетического турбидиметрического анализа мутность испытуемых растворов постоянно мониторируется прибором. Измеряется время, необходимое для достижения заданного уровня абсорбции для раствора испытуемого образца. Это время определяется программой как T_a (время активации).

Программа производит логарифмическую корреляцию \log (ось x)/ \log (ось y) значения T_a по каждому стандарту с соответствующей концентрацией эндотоксина. T_a – это время, необходимое для достижения порогового значения оптической плотности, равного 0,015, растворами стандартов или образцов. Концентрация эндотоксинов в неизвестном образце рассчитывается с помощью калибровочной кривой, исходя из соответствующего значения T_a для образца. Пример серии стандартов и значения определенной в опыте концентрации эндотоксина в положительном контроле препарата (добавленная концентрация эндотоксина составляет 1,0 ЕЭ/мл) представлен ниже:

Данные анализа:

Стандарты	КСЭ (ЕЭ/мл)	T_a (сек)	Log Концентрации	Log T_a (сек)	
NC Отрицательный контроль	0	NR	-----	-----	
STD1	10	480	1.000	2.681	
STD2	1	792	0.000	2.889	
STD3	0.1	1416	-1.000	3.151	
			slope	-0.2349	
			y-intercept	2.910	
			coefficient of correlation	-0.999	

		Ta (сек)	Log Ta (сек)	Рассчитанное значение ЕЭ/мл	% Recovery
Препарат 1	NPC1	NR	-----	-----	
	PPC1	816	2.912	0.987	98.7%
Препарат 2	NPC2	NR	-----	-----	-----
	PPC2	780	2.892	1.196	119.6%

NR= Не прореагировал

В данном примере положительный контроль препарата (PPC) для каждого испытуемого препарата уложился в допустимые пределы, что показывает, что в препаратах нет заметного усиления или ингибирования реакции. В испытуемом препарате (NPC) и в отрицательном контроле (NC) содержание эндотоксинов оказалось значительно ниже, чем концентрация эндотоксина в самом низком стандарте.

Критерии анализа:

Должна быть подтверждена линейность стандартной кривой в диапазоне концентраций эндотоксина, используемых для определения содержания уровня эндотоксинов. Должен быть проведен анализ стандартной кривой, состоящий как минимум из трех концентраций эндотоксина, охватывающих желаемый диапазон, а также из отрицательного контроля (вода для ЛАЛ-теста). Данный анализ проводится как минимум в трех повторностях. Следует обратиться к критериям достоверности для стандартной кривой в USP. Абсолютное значение коэффициента корреляции должно быть более или равно значению 0,980 (6).

Литература

1. Cooper, J.F., Levin, J., and Wagner, H.N. "Quantitative Comparison of in Vitro and In Vivo Methods for Detection of Endotoxin" J. Lab, Clin, Med., 78, p.128 (1971).
2. Hochstein, H.D. "The LAL Test versus the Rabbit Pyrogen Test for Endotoxin Detection; Update '87." Pharm. Technol., 11(6), p. 124 (1987).
3. Levin, J. and Bang, F.B. "Clottable protein in *Limulus*: Its Localization and Kinetics of its Coagulation by Endotoxin." Thromb. Dieth. Haemonti., 19, p. 186 (1966).
4. Tai, J.Y. and Llu. T.Y. "Studies on Limulus Lysate, Isolation of Pro-clotting Enzyme." J. Biol, Chem., 252, p.2176 (1977).
5. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test of Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices. U.S. Dept. of Health & Human Services, FDA, December 1987.
6. "Bacterial Endotoxins Test." The United States Pharmacopeia, most current version. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
7. Cooper, J.F., Weary, M.E., and Jordon, J.T. "The Impact of Nonendotoxin LAL-Reactive Materials on *Limulus* Amebocyte Lysate Analysis." L. Parent, Sci & Tech, 51(1), (1966).

8. Tsuchiya, M., Oishi, H., Takaoka, A., Fusamoto, M. and Matsuura, S. "Discrimination between endotoxin and (1 – 3) beta-D-glucan using turbidimetric kinetic assay with Limulus ameocyte lysate." Chem Pharm Bull (Tokyo), 38(9). p. 2523 (1990).

Произведено:

Wako Chemicals USA, Inc.

LAL Division

1600 Bellwood Road

Richmond, VA 23237

License No. 1762



Тел: +7 499 682 61 09

E-mail: mail@algimed.ru