

ЛИЗАТ АМЕБОЦИТОВ LIMULUS

КАРТРИДЖИ ENDOSAFE™ PTS

КАРТРИДЖИ НА ОДНО ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ С ПОРТАТИВНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМОЙ ENDOSAFE™ PTS И С СИСТЕМОЙ ENDOSAFE™ MCS, ИСПОЛЬЗУЮЩЕЙ ОДНОВРЕМЕННО ДО ПЯТИ КАРТРИДЖЕЙ

НАЗНАЧЕНИЕ

Карtridge однократного использования содержат Лизат амебоцитов Limulus (ЛАЛ-реактив), эндотоксин и искусственный хромогенный субстрат. Карtridge предназначены для количественного определения бактериальных эндотоксинов кинетическим хромогенным методом с использованием Портативной тест-системы Endosafe™ PTS.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Настоящий реактив предназначен для обнаружения содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, ветеринарных препаратах, биологических препаратах и изделиях медицинского назначения. Реактив не предназначен для клинической диагностики.

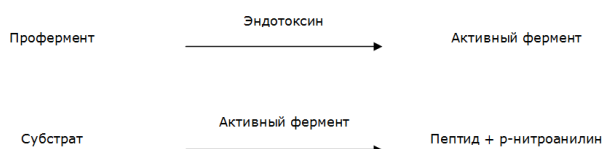
ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Фредерик Банг (Frederick Bang) обнаружил, что бактерии вызывают внутрисосудистое свертывание у мечехвостов *Limulus polyphemus* (1). В совместной работе Левина (Levin J.) и Банга (Bang F.B.) (5) было продемонстрировано, что факторы свертывания содержатся в клетках крови мечехвоста – амебоцитах, а реакция свертывания, вызываемая пирогенами (бактериальными эндотоксинами), является ферментативной.

ЛАЛ-тест является наиболее чувствительным и высокоспецифичным способом оценки содержания бактериальных эндотоксинов - фрагментов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которые являются наиболее известными пирогенами. Основой метода являются легко измеряемые изменения, происходящие в ЛАЛ-реактиве под действием эндотоксинов (1-4,5). Простота и экономичность ЛАЛ-теста позволяют использовать его в качестве средства внутрипроизводственного контроля, контроля качества сырья и готовых лекарственных средств, изделий медицинского назначения (8). В статье «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США описаны способы валидации ЛАЛ-теста, позволяющие использовать его вместо анализа на кроликах (7).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ

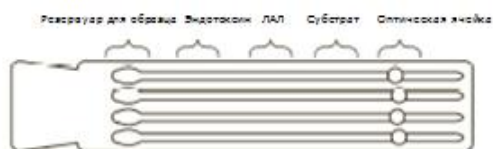
В этом анализе бактериальные эндотоксины приводят к последовательной активации нескольких ферментов, сериновых протеаз, присутствующих в ЛАЛ-реактиве. Последний из ферментов, составляющих этот каскад - профермент, разрезает находящийся в ЛАЛ-реактиве белок-субстрат, называемый коагулогеном. Изменение свойств субстрата приводит к помутнению реакционной смеси, которое заканчивается гелеобразованием. Для измерения активности активированного эндотоксином профермента может быть использован синтетический аналог коагулогена. Этот синтетический субстрат также разрезается проферментом, что приводит к высвобождению хромофора - р-нитроанилина (pNA). Желтая окраска р-нитроанилина может быть измерена фотометрически при длине волны 385-410 нм. С помощью спектрофотометра можно провести кинетический колориметрический анализ, измерив значение оптической плотности реакционной смеси.



Система Endosafe-PTS, включающая cartridge и прибор, использует принцип определения эндотоксина, который применяется в хромогенном кинетическом анализе и хромогенном анализе по конечной точке. В этих методах измеряется интенсивность окраски реакционной смеси, которая находится в прямой зависимости от концентрации эндотоксина в образце. Каждый cartridge содержит точные количества лицензированных FDA ЛАЛ-реактива, хромогенного субстрата и Контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ).

РЕАКТИВЫ В КАРТРИДЖЕ

Каждый картридж Endosafe-PTS имеет четыре канала, в которые внесены ЛАЛ-реактив и хромогенный субстрат. В два из четырех каналов дополнительно внесен контрольный стандарт эндотоксина (спайк), который служит в качестве положительного контроля испытуемого препарата. Такое сочетание из двух каналов для проверки образца и двух каналов для положительного контроля находится в полном соответствии с требованиями к проведению фотометрических методов фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины». Система Endosafe PTS может быть использована для определения содержания эндотоксинов в широком диапазоне концентраций.



Каналы для испытуемого образца



Каналы для положительного контроля испытуемого образца



УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ОБЩИЕ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Картриджи относительно стабильны и могут храниться при температуре 2-25°C. Перед вскрытием упаковки и проведением анализа следует выдержать картриджи при комнатной температуре, чтобы дать им нагреться. Следует избегать продолжительного воздействия температур выше 25°C. Для того, чтобы минимизировать риск привнесения загрязнений в резервуары для образца, картриджи необходимо использовать немедленно после вскрытия упаковки. Картриджи могут быть использованы однократно.

РЕАКТИВЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

Вода для ЛАЛ-теста необходима для начальной квалификации каждой новой серии картриджей PTS.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

Дозатор (Endosafe PTS400 или аналогичный) и стерильные наконечники.

Для сбора образцов и подготовки разведений необходимы апиrogenные стеклянные пробирки для разведений или пробирки из полистирола (Endosafe T300 или аналогичные).

Для подготовки разведений может потребоваться вихревая мешалка.

ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩЕЕ В ПОСТАВКУ

Прибор Endosafe PTS (портативная тест-система) - специальный инструмент, который использует картриджи для проведения ЛАЛ-теста. Прибор включает: камеру инкубирования, микронасос, четыре светодиода и четыре детектора, буквенно-цифровую клавиатуру, дисплей и микропроцессор. Прибор может работать от сети или от встроенного аккумулятора. Аккумулятор также используется как источник резервного питания для сохранения данных при сбое электроснабжения.

Прибор Endosafe MCS (система мульти-картриджей) - специальный инструмент, который использует для проведения ЛАЛ-теста пять картриджей независимо друг от друга. Каждый прибор MCS может анализировать до пяти картриджей. Картриджи можно анализировать одновременно или независимо

друг от друга в любой последовательности. Прибор имеет пять слотов для измерения, каждый из которых включает в себя камеру инкубирования, микронасос, четыре светодиода и четыре детектора. Прибор PTS измеряет время реакции в каждом из каналов. Для каждой серии картриджей используется индивидуальная архивированная калибровочная кривая, представляющая отношение логарифма времени реакции к логарифму концентрации эндотоксина. Содержание эндотоксина в каналах с образцом и положительным контролем рассчитывается по этой кривой с использованием полученных данных по времени реакции. Значения, используемые для построения архивированной кривой, указаны в Сертификате Анализа, который сопровождает каждую серию картриджей.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы, подлежащие анализу, отбирают и готовят с использованием депирогенизированных материалов и реактивов, не содержащих эндотоксинов. Стеклопосуда должна быть депирогенизирована в соответствии с валидированной процедурой, например, 30 минут при 250°C (7). Рекомендуется заранее проверять на содержание эндотоксинов те материалы, которые не могут быть подвергнуты сухожаровой депирогенизации или материалы, которые поставляются без маркировки «не содержат эндотоксинов». Следует использовать асептическую технику работы.

Критерии достоверности определения

Используются следующие критерии достоверности определения содержания эндотоксина. Для положительного контроля испытуемого образца определенная концентрация должна составлять 50-200% от ожидаемого значения. Коэффициент вариации (%CV) измеренного значения времени реакции в парных каналах для препарата и положительного контроля должен быть не более 25%. Важно: согласно требованиям статьи «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США (7) испытуемые образцы следует проверять в разведении (не превышающем значения МДР), в котором отсутствуют факторы, мешающие реакции, такие как: неоптимальное значение pH, высокие концентрации солей или значительное фоновое содержание эндотоксина.

ТИПЫ АНАЛИЗОВ

Первоначальная квалификация: Каждая новая серия картриджей должна быть проверена. Для первичной проверки используется один картридж, к которому добавляют воду для ЛАЛ-теста. Результаты считаются приемлемыми, если содержание эндотоксина не регистрируется, а концентрация эндотоксина, определенная в положительном контроле, укладывается в установленные рамки (50-200%).

Ингибирование/Усиление: Отсутствие мешающих факторов в испытуемом образце может быть подтверждено приемлемыми результатами, полученными для положительного контроля испытуемого препарата (50-200%). Данные требования к результатам, полученным для положительного контроля испытуемого препарата применяются как при проведении рутинных анализов, так и при валидации препарата, проводимой на трех сериях. При проведении валидации испытуемого препарата на трех сериях рекомендуется проводить измерение значения pH смеси ЛАЛ-реактив/испытуемый препарат. Эта операция может быть сделана после успешного завершения теста. Для этого следует наклонить картридж по направлению к лункам и отобрать от 50 до 100 мкл испытуемого препарата, используя тот же дозатор с тем же наконечником, которыми был добавлен испытуемый препарат. Для измерения значения pH может быть использован микроэлектрод или индикаторная бумага.

ВНИМАНИЕ: Исторически правила валидации, описанные в Руководстве FDA по валидации ЛАЛ-теста требовали проведение проверки на трех сериях испытуемого образца в одном и том же разведении.

Ингибирование обычно зависит от концентрации, и его легко преодолеть, делая разведения испытуемого образца на воде для ЛАЛ-теста. Обычно причиной ингибирования бывают: 1) факторы, мешающие протеканию ферментативной реакции гелеобразования, такие как высокое содержание солей или неоптимальное значение pH и 2) факторы, изменяющие свойства контрольного стандарта эндотоксина (6). Если в положительном контроле испытуемого образца получены неудовлетворительные результаты и предполагается, что проблема может быть связана со значением pH, следует проверить pH испытуемого образца, убедившись, что его значение находится в интервале 6-8. В случае необходимости доведения pH можно использовать Трис Буфер (Endosafe BT101, BT103 или аналогичный). Нет необходимости в обязательном доведении значения pH растворов с низкой буферной емкостью.

Максимально Допустимое Разведение: В фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» установлена пороговая пирогенная доза, равная 5 ЕЭ/кг для внутривенных препаратов и 0,2 ЕЭ/кг для интратекальных препаратов. Фармакопея США утвердила значения содержания бактериальных эндотоксинов для конкретных лекарственных препаратов (7). Эти значения могут быть использованы для расчета степени разведения испытуемого препарата, которое может быть необходимо для преодоления ингибирования, и при этом не будет означать превышения значения предельного содержания эндотоксинов в испытуемом препарате (9).

Максимально Допустимое Разведение может быть рассчитано по формуле, приведенной в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (7).

Для лекарственных препаратов с установленным значением предельного содержания бактериальных эндотоксинов МДР рассчитывается по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов} \times \text{Концентрация испытуемого раствора}}{\lambda}$$

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов = K/M ,

где $K = 5 \text{ ЕЭ/кг}$;

M = Максимальная доза препарата, вводимая в течение часа на 1 кг массы тела;

λ = чувствительность (наименьшая из концентраций эндотоксина, используемых для построения калибровочной кривой) картриджа.

Например, значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для стерильной воды для ирригации должно быть не более 0,25 ЕЭ/мл. Если используется картридж с архивированной калибровочной кривой, в которой наименьшей концентрацией эндотоксина является 0,05 ЕЭ/мл, значение МДР будет равно 1/5. Таким образом, испытуемый образец воды для ирригации для преодоления возможного ингибирования может быть разведен до разведения 1/5.

Рутинные анализы с использованием картриджей Endosafe-PTS: Подробное описание процедуры анализа, правил работы с прибором и правил валидации метода приведено в Руководстве пользователя для приборов Endosafe-PTS и Endosafe-MCS.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bang, F. B. "A Bacterial Disease of *Limulus Polyphemus*," Bulletin of Johns Hopkins Hospital, Nr. 98, p. 325 (1956).
2. Cooper, J.F. Levin, J., and Wagner, H.N. "Endotoxin as a Cause of Aseptic Meningitis after Radionuclide Cisternography," Journal of Nuclear Medicine, Nr. 16, p. 809 (1976).
3. Cooper, J.F., Levin, J., and Wagner, H.N. "Quantitative Comparison of In Vitro and In Vivo Methods for the Detection of Endotoxin," Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Nr. 78, p. 138 (1971).
4. Hochstein, H.D., "The LAL Test versus the Rabbit Pyrogen Test for Endotoxin Detection: Update '87," Pharmaceutical Technology, Nr. 11(6), p. 124 (1987).
5. Levin, J. and Bang, F.B., "Clottable Protein in *Limulus*: Its Localization and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin," Thromb. Diath. Haemorrh., Nr. 19, p. 186 (1968).
6. Cooper, J.F. "Resolving LAL Test Interferences." Journal of Parenteral Science and Technology, Nr. 44:1, p. 13 (1990).
7. Bacterial endotoxin test <85>. In The U.S. Pharmacopeia, 34rd rev., United Book Press, Inc., Baltimore, MD.
8. McCullough, K.Z. "Process Control: In-process and Raw Material Testing Using LAL." Pharmaceutical Technology, 12(5) p. 40 (1988).
9. Weary, M.E. "Understanding and setting endotoxin limits." Journal of Parenteral Science and Technology, 44:1., p. 16(1990).

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

Charles River Endosafe, Division of Charles River Laboratories, Inc
1023, Wappo Road, 43-B, Charleston, SC 29407, USA
Phone: (843) 766-7575; FAX: (843) 766-7676
www.criver.com

ПОСТАВЩИК:

ООО «НПО «ЛАЛ-Центр»

117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д.3А
Тел.: +7 (495)517-40-37
e-mail: lalnews@limulustest.ru
www.limulustest.ru