

ЛАЛ-РЕАКТИВ RAPID, ПРОБИРКИ НА ОДНО ОПРЕДЕЛЕНИЕ

RAPID LAL SINGLE-TEST VIALS

ENDOSAFE®

ПРОБИРКИ НА ОДНО ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ (ПИРОГЕНОВ) В РАСТВОРАХ ДЛЯ ДИАЛИЗА, ВОДЕ ДЛЯ ДИАЛИЗА И ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ.

НАЗНАЧЕНИЕ

Ф на одно определение Rapid LAL Single-Test Vial представляют собой лизат амебоцитов *Limulus Polyphemus* и предназначены для количественного определения эндотоксинов с помощью гель-тромб теста.

ВНИМАНИЕ: Этот продукт не лицензирован FDA. ЛАЛ-реактив Rapid, пробирки на одно определение не должны использоваться для контроля качества лекарственных препаратов и изделий медицинского назначения, контроль которых осуществляется FDA.

НАЗНАЧЕНИЕ

ЛАЛ-реактив Rapid, пробирки на одно определение предназначены для мониторинга содержания бактериальных эндотоксинов в воде для диализа, в растворах для диализа и в образцах, представляющих исследовательский интерес. Эндотоксины являются фрагментами грамотрицательных бактерий и также, как и бактерии, могут присутствовать в системах очистки воды. ЛАЛ-тест является наиболее чувствительным и высокоспецифичным способом оценки содержания бактериальных эндотоксинов. Анализ основан на способности ЛАЛ-реактива образовывать твердый гель при реакции с эндотоксинами в определенных концентрациях.

ИСТОЧНИКИ ЭНДОТОКСИНОВ

Различные способы очистки воды, такие как, например, обратный осмос, используются для того, чтобы минимизировать содержание химических примесей, бактерий, их токсичных производных, а также бактериальных эндотоксинов в установках для диализа. И хотя обратноосмотические мембраны задерживают большинство бактерий, некоторые бактерии все же могут попадать в системы распределения и хранения воды. В системах очистки воды могут быть обнаружены грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* и *Alcaligenes*. В любой части системы очистки воды могут образовываться биопленки, представляющие собой колонии бактерий на желатинообразном матриксе, являющимся продуктом жизнедеятельности бактерий. Биопленки прочно адгезируются на поверхностях (мембраны, трубы и т.д.), и однажды образовавшуюся биопленку трудно удалить. Если процедуры санирования не проводятся или проводятся неудовлетворительно, содержание грамотрицательных бактерий и бактериальных эндотоксинов может достигнуть высокого уровня. Единственным способом поддержания низких концентраций эндотоксинов на постоянном уровне является постоянно повторяемое санирование систем получения воды, предотвращающее образование биопленок внутри установок. ЛАЛ-реактив Rapid, пробирки на одно определение используются для проверки воды из различных точек забора для оценки эффективности работы обратноосмотических мембран и эффективности процедур санирования.

ПРИРОДА ЭНДОТОКСИНОВ (ПИРОГЕНОВ)

Эндотоксины, которые являются наиболее известными пирогенами, представляют собой высокомолекулярный комплекс, связанный с клеточной стенкой грамотрицательной бактерии. Они легко срываются с внешней стенки бактерий и оказываются в окружающей среде. Их присутствие в водопроводной воде составляет обычно от 5 до 50 ЕЭ/мл. К сожалению, эндотоксины очень стабильны, их трудно разрушить дезинфицирующими растворами, и они легко проходят через стерилизующие фильтры. Удалить из воды эндотоксины можно только с помощью ультрафильтрации.

Основными проявлениями пирогенной реакции являются лихорадка и чувство озноба, также могут наблюдаться снижение артериального давления и нарушение дыхания. Медиаторами реакции являются цитокины, такие как интерлейкин-1. Быстрое нарастание симптоматики происходит через 1-3 часа после попадания эндотоксина в организм, с максимум проявлений через 3-6 часов (1,2). Бета-2-микроглобулин-зависимый амилоидоз и сокращение продолжительности жизни, обусловленное сердечно-сосудистыми заболеваниями, связывают с длительным воздействием эндотоксина (3,4).

ПРИРОДА ЛАЛ-ТЕСТА

Гель-тромб тест - простой и воспроизводимый анализ, который проводится путем смешивания ЛАЛ-реактива и испытуемого раствора для диализа или воды и последующего инкубирования реакционной смеси при температуре 37°C определенный период времени. Положительный результат означает, что содержание эндотоксинов в образце равно или больше чувствительности ЛАЛ-реактива, которая обозначается буквой λ. Реакция должна проводиться при нейтральном значении pH и зависит от времени и концентрации. Анализ проводят для водных растворов. В большинстве случаев действие факторов, мешающих проведению реакции, является следствием высоких концентраций солей и может быть преодолено с помощью разведений испытуемого раствора водой для ЛАЛ-теста.

ГЕМОДИАЛИЗ

Стандарты на воду для гемодиализа

Активность эндотоксинов выражается в единицах Международного Стандарта эндотоксина. В Европейской Фармакопее содержание эндотоксина выражается в Международных Единицах, МЕ/мл, в Фармакопее США содержание эндотоксина выражается в Единицах Эндотоксина, ЕЭ/мл. Эти единицы эквивалентны (1 ЕЭ = 1 МЕ), поскольку для их определения используется один и тот же Международный стандарт эндотоксина. Согласно Европейской Фармакопее вода, используемая для разведения концентрированных диализных растворов, должна содержать не более 100 КОЕ/мл и не более 0,25 Единиц Эндотоксина в мл. Хотя эти цифры, приведенные в Европейской Фармакопее, не являются официальными требованиями, на них можно ориентироваться при оценке содержания эндотоксинов в воде. Организации, работающие в области нефрологии во многих странах Европы, используют аналогичные нормы на предельное содержание жизнеспособных микроорганизмов и эндотоксинов.

Частота проведения исследований

Европейская Ассоциация по Диализу и Трансплантологии (The European Dialysis and Transplant Nurses Association) и Европейская Ассоциация Нефрологов (European Renal Care Association) (EDTNA/ERCA) рекомендуют устанавливать периодичность микробиологического контроля, основываясь на статистических данных и на частоте проведения процедур обработки систем водоподготовки. Например, если интервалы между дезинфекцией системы короткие, а результаты анализов подтверждают эффективность программы поддержания качества воды, считается допустимым проведение анализа ежемесячно. Однако, если интервалы между процедурами дезинфекции продолжительные, и данные прошлых анализов указывают на возможное содержание эндотоксинов, или если нет архивных данных вообще, для обеспечения безопасности пациентов анализы следует проводить еженедельно. Еще один важный элемент этих рекомендаций заключается в указании на необходимость проведения анализа эндотоксинов на месте функционирования системы водоподготовки. Таким образом, результаты плановой проверки становятся известны сразу после проведения анализа. Возможность проведения анализа на месте позволяет также осуществлять немедленную проверку растворов, вызвавших реакцию у пациентов, и таким образом, нарушения могут быть легко идентифицированы и исправлены. Эти руководства также рекомендуют использовать обедненные агаризованные среды (low-nutrient agar) для мониторинга микроорганизмов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

ЛАЛ-реактив Rapid, пробирки на одно определение могут быть также использованы для определения эндотоксинов в образцах, представляющих научно-исследовательский интерес в случаях, когда анализ не обязательно проводить с помощью ЛАЛ-реактива, лицензированного FDA.

СОДЕРЖАНИЕ НАБОРОВ

Каждая упаковка с пробирками ЛАЛ-реактива Rapid (зеленые колпачки) и с пробирками Положительного Контроля для ЛАЛ-реактива Rapid (красные колпачки) содержит по 50 флаконов. ЛАЛ-реактив содержит одно- и двухвалентные катионы и буфер. В пробирках с Положительным Контролем содержится ЛАЛ-реактив, лиофилизированный вместе с известным количеством эндотоксина. Пробирки с Положительным Контролем используются для проверки ингибирования реакции, которое может приводить к получению ложноотрицательных результатов.

Ллиофилизированный ЛАЛ-реактив и Положительный Контроль должны храниться при температуре 2-8°C, следует избегать воздействия температур выше 25°C. Пробирки, в которых появилось желтое окрашивание лиофилизата, не должны использоваться.

МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР

Водяная баня или термоблок для инкубирования реакционной смеси при температуре 37°C ± 1°C.

ПОДГОТОВКА РЕАКТИВА

ЛАЛ-реактив Rapid, пробирки на одно определение

Внимание: Пробирки на одно определение с красными и зелеными колпачками должны инкубироваться немедленно после разведения испытуемым образцом или контролем. Каждый флакон с ЛАЛ-реактивом или с Положительным Контролем следует разводить, добавляя непосредственно во флакон 0,2 мл испытуемого образца.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Образцы, подлежащие анализу с помощью ЛАЛ-реактива Rapid, отбирают и готовят с использованием депирогенизированных материалов. Для переноса аликвот испытуемого образца в пробирку с ЛАЛ-реактивом и Положительным Контролем можно использовать стерильные, апиrogenные шприцы.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Пробирки с зелеными колпачками с ЛАЛ-реактивом Rapid служат для проведения опыта. Пробирки с красными колпачками с Положительным Контролем используются для проверки ингибирования. Перед использованием собирают содержимое пробирок, аккуратно постукивая дном пробирки по твердой поверхности.

Асептически отбирают испытуемую воду или диализный раствор в стерильный, апиrogenный контейнер.

Асептически переносят 0,2 мл испытуемого образца в пробирку с зеленым колпачком, в которой будет проводиться анализ. Асептически переносят 0,2 мл испытуемого образца в пробирку с красным колпачком для постановки Положительного Контроля. Немедленно помещают пробирки в водяную баню или термоблок при температуре 37°C. Инкубируют в течение времени, указанного на этикетке флакона (+ 2 минуты) в зависимости от желаемой чувствительности реактива. Исключительно важно точное выдерживание времени инкубирования.

Поскольку реакция ЛАЛ-реактива зависит от температуры, следует проверять температуру в устройстве для инкубирования. Реакция гелеобразования очень чувствительна к колебаниям и толчкам и может быть необратимо нарушена в случае неаккуратного обращения с пробирками в течение времени инкубирования.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

В геле-тромб тесте результат, полученный для каждой пробирки, может быть либо отрицательным, либо положительным. Положительным результатом считается образование плотного геля, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180°. Отрицательный результат характеризуется отсутствием геля или формированием вязких гелевых масс, которые не сохраняют своей целостности при переворачивании пробирки. Результаты теста достоверны только в том случае, если для положительного контроля за выбранный интервал инкубирования были получены положительные результаты.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

ЛАЛ-реактив Rapid стандартизован по Национальному стандарту эндотоксина, и его чувствительность выражена в Единицах Эндотоксина на миллилитр (ЕЭ/мл). Внимание: Экспертным Комитетом по Стандартизации ВОЗ активность Международного Стандарта принята равной 10 000 МЕ/флакон, таким образом, 1ЕЭ = 1 МЕ.

ИНГИБИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ

Поскольку реакция ЛАЛ-реактива и эндотоксина является ферментативной, нельзя исключить возможность ингибирования активности ферментов, участвующих в реакции. Причиной ингибирования может быть химический состав испытуемых образцов или нарушение условий проведения опыта. Возможность ингибирования со стороны испытуемого препарата должна быть исключена при проведении любого анализа. Пробирки с красными колпачками для Положительного Контроля служат для проверки возможности ингибирования реакции.

Если в процессе проведения рутинного анализа в пробирках с положительным контролем не произошло образования геля, необходимо измерить значение pH испытуемого образца. Это значение для реакционной смеси ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата должно быть от 6,0 до 8,0. Довести значение pH можно с использованием апиrogenных растворов HCl или NaOH (обычно в концентрации, равной или меньшей 0,1N), или с помощью Трис буфера (Charles River Endosafe). Без необходимости не следует доводить pH растворов с низкой буферной емкостью.

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, и 2) факторы, изменяющие свойства контрольного стандарта эндотоксина.

ОГРАНИЧЕНИЯ

В ЛАЛ-тесте могут быть испытаны образцы, которые не оказывают ингибирующего или усиливающего действия на реакцию, или если эти явления могут быть устранены соответствующим разведением.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Favero MS, Alter MJ, Tokars JI., & Arduino MJ. Dialysis-associated infections and their control. In: Bennett JV., & Brachman PS., eds. *Hospital Infections, Fourth Edition*, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1990, 357-380.
2. Ledebro I & Nystrand R. Defining the microbiological quality of dialysis fluid. *Artificial Organs* 23: 37-43, 1999.
3. Dinarello CA., Kock K.M., & Shaldons S. Interleukin-1 and its relevance in patients treated with hemodialysis. *Kidney Int.* 33 (Suppl. 24): S21-S26, 1988.
4. Lowrie, EG., Conceptual model for a core pathobiology of uremia, with special reference to anemia, malnourishment and mortality among dialysis patients. *Seminars in Dialysis* 10: 115-129, 1997.
5. Gas B, Goy G, & Lehuède S. Hemofiltration and Hemodialyse. *LAL Notes (Fr.)* VI.2, Automne 2000.

SIGNIFICANT TEXTS ON LAL TESTING

Bacterial Endotoxins: Structure, Biomedical Significance, and Detection With the Limulus Amebocyte Lysate Test. Editors: J.W. ten Cate, H.R. Buller, A.Strunk and J.Levin. Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 189, Alan R. Liss. Inc., NY, 1985.

Pearson F.C. Pyrogens: Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. Marcel Dekker, New York and Basel, 1985

Endotoxins and their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test. Editors: S.Watson, J.Levin., T.Novitsky. Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 93, Alan R. Liss. Inc., NY, 1982.

Guideline on the Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an Endproduct Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Dept. of Health & Human Services, FDA, December 1987.

Bacterial endotoxin test <85>. In The U.S. Pharmacopeia, 36rd rev., United Book Press, Inc., Baltimore, MD.

Manufactured By: CHARLES RIVER ENDOSAFE

Div. of Charles River Laboratories, Inc.

1023 Wappo Road, Suite 43B

Charleston, SC 29407, USA

PHONE NUMBER: 843-766-7575

FAX NUMBER: 843-766-7676

PIR13502