

# ЛИЗАТ АМЕБОЦИТОВ LIMULUS

## КАРТРИДЖИ ENDOSAFE™ PTS

U.S. License No. 1197

КАРТРИДЖИ НА ОДНО ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ/УСИЛЕНИЯ РЕАКЦИИ

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ ENDOSAFE™

### НАЗНАЧЕНИЕ

Карtridge однократного использования содержат Лизат амебоцитов Limulus (ЛАЛ-реактив), эндотоксин и искусственный хромогенный субстрат. Карtridge предназначены для определения возможности ингибирования/усиления реакции со стороны испытуемого препарата при определении содержания бактериальных эндотоксинов кинетическим хромогенным методом с использованием тест-системы Endosafe™.

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Данный продукт не лицензирован FDA. Карtridge для определения возможности ингибирования/усиления реакции не должны использоваться для контроля качества готовых препаратов или проведения валидации лекарственных препаратов, изделий медицинского назначения или биологических препаратов, производство и обращение которых регулируется FDA. Однако cartridge для определения возможности ингибирования/усиления реакции являются инструментом, который может быть использован для быстрого определения подходящей техники подготовки испытуемого препарата для проведения последующей официальной валидации ЛАЛ-теста для данного испытуемого препарата.

### 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 (10). В статье «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США, а также в Руководстве FDA по валидации ЛАЛ-теста описаны способы валидации ЛАЛ-теста, позволяющие использовать его вместо анализа на кроликах (7,9).

### 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.

Профермент

Эндотоксин

Активный фермент

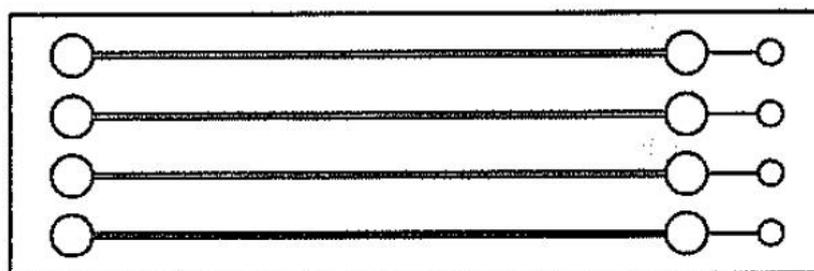


Система Endosafe-PTS/MCS, включающая картриджи и прибор, использует принцип определения эндотоксина, который применяется в хромогенном кинетическом анализе и хромогенном анализе по конечной точке. В этих методах измеряется интенсивность окраски реакционной смеси, которая находится в прямой зависимости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

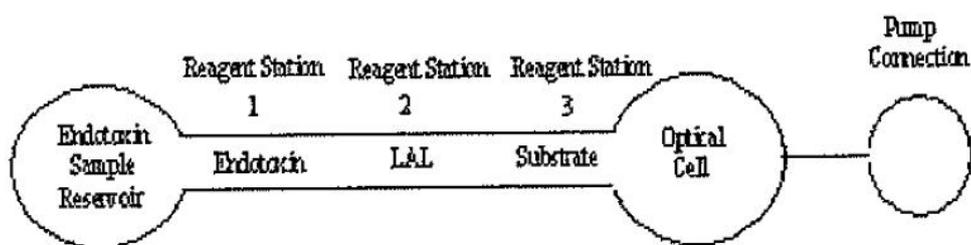
### РЕАКТИВЫ В КАРТРИДЖЕ

Каждый картридж Endosafe-PTS/MCS имеет четыре канала, в которые внесены ЛАЛ-реактив, контрольный стандарт эндотоксина (спайк) и хромогенный субстрат. Все четыре канала служат в качестве положительного контроля испытуемого препарата.

Четыре канала картриджа PTS/MCS



Каналы для положительного контроля испытуемого образца (спайка)



### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ОБЩИЕ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Картриджи относительно стабильны и могут храниться при температуре не выше 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 предназначены для однократного использования.

### 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 - 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.

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

### **ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Образцы, подлежащие анализу, отбирают и готовят с использованием депирогенизированных материалов и реактивов, не содержащих эндотоксинов. Стеклянная посуда должна быть депирогенизирована в соответствии с валидированной процедурой, например, 30 минут при 250°C (9). 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.

### **ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**

Используются следующие критерии достоверности определения содержания эндотоксина. Для положительного контроля испытуемого образца определенная концентрация бактериальных эндотоксинов 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%.

Прибор Endosafe 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 положительным контролем рассчитывается по этой кривой с использованием полученных данных по времени реакции.

### **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 концентрация эндотоксина, определенная в положительном контроле во всех четырех каналах укладывается в установленные рамки (50-200%).

Ингибирование/Усиление: Отсутствие мешающих факторов в испытуемом образце может быть продемонстрировано путем получения приемлемых результатов для положительного контроля испытуемого препарата (50-200%). Данный картридж является инструментом, предназначенным для быстрого определения соответствующего разведения/концентрации испытуемого препарата и/или другого способа пробоподготовки препарата для проведения ЛАЛ-теста. Выбранный способ пробоподготовки испытуемого препарата затем может быть использован при проведении валидации на трех сериях испытуемого препарата с использованием картриджей, содержащих два канала для испытуемого препарата и два канала для положительного контроля испытуемого препарата.

Ингибирование обычно зависит от концентрации испытуемого препарата, 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 6,7 - 7,3. В случае необходимости доведения pH можно использовать свободный от эндотоксинов 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 (7). Фармакопея США утвердила значения содержания бактериальных эндотоксинов для конкретных лекарственных препаратов (9). 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 (11).

Максимально Допустимое Разведение может быть рассчитано по формуле, приведенной в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (7,9).

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 = К/М,

где К = 5 ЕЭ/кг;

М = 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 5. Таким образом, испытуемый образец воды для ирригации для преодоления возможного ингибирования может быть разведен до разведения 1/5.

Проведение анализа по определению ингибирования/усиления реакции: Для того, чтобы определить разведение испытуемого препарата, свободное от мешающих факторов, в каждую лунку картриджа можно добавлять разное разведение испытуемого препарата. Также в каждую лунку можно добавлять различные испытуемые препараты. Типовая последовательность процедуры анализа приведена ниже:

#### 1. Включение прибора

- Для включения прибора нажмите кнопку «Меню» (выключение прибора - комбинация клавиш «Меню» + «5»).
- Прибор начинает процедуру самотестирования «SYSTEM SELF TEST». Одновременно с этим блок инкубирования разогревается до 37° С, что занимает около 5 минут.
- По завершении нагрева на дисплее последовательно появятся следующие сообщения:

«SELF TEST OK»

САМОТЕСТИРОВАНИЕ - ОК

«INSERT CARTRIDGE»

ВСТАВЬТЕ КАРТРИДЖ

Внимание: Дайте картриджу нагреться до комнатной температуры до вскрытия упаковки.

#### 2. Картридж

Дайте картриджу нагреться до комнатной температуры. Вскройте упаковку картриджа и вставьте его в приемный слот прибора. Вставляя картридж следует так, чтобы лунки резервуаров для образцов были повернуты вверх. Не касайтесь пальцами зоны картриджа, в которой расположены оптические ячейки.

Вставляйте картридж аккуратно, до полной его фиксации.

#### 3. Ввод необходимой информации

После того, как картридж вставлен в слот прибора до полного упора, начинается ввод необходимой для анализа информации. На дисплее последовательно появляются следующие сообщения:

<i>Enter OID</i>	<i>Введите имя или код оператора, проводящего анализ</i>
<i>Enter Lot #</i>	<i>Введите номер серии картриджа</i>
<i>Enter Calibration Code</i>	<i>Введите калибровочный код</i>

(Калибровочный код указан в Сертификате Анализа. Если он уже был введен ранее для используемой серии картриджей, прибор не будет предлагать вводить калибровочный код повторно).

<i>Lot #</i>	<i>Серия №</i>
<i>Cancel or Enter</i>	<i>Отмена или Ввод</i>

(Это сообщение необходимо для подтверждения введенного номера серии картриджа. Если будет нажата кнопка «Отмена», процедура ввода начнется вновь с этапа ввода номера серии картриджа).

<i>Enter Sample 1 Lot #</i>	<i>Введите номер серии испытуемого образца 1</i>
<i>Enter Sample 2 Lot #</i>	<i>Введите номер серии испытуемого образца 2</i>
<i>Enter Sample 3 Lot #</i>	<i>Введите номер серии испытуемого образца 3</i>
<i>Enter Sample 4 Lot #</i>	<i>Введите номер серии испытуемого образца 4</i>

<i>Enter Sample 1 ID</i>	<i>Введите идентификатор образца 1</i>
<i>Enter Sample 2 ID</i>	<i>Введите идентификатор образца 2</i>
<i>Enter Sample 3 ID</i>	<i>Введите идентификатор образца 3</i>
<i>Enter Sample 4 ID</i>	<i>Введите идентификатор образца 4</i>

<i>Enter Dilution #1 Factor</i>	<i>Введите фактор разведения 1</i>
<i>Enter Dilution #2 Factor</i>	<i>Введите фактор разведения 2</i>
<i>Enter Dilution #3 Factor</i>	<i>Введите фактор разведения 3</i>
<i>Enter Dilution #4 Factor</i>	<i>Введите фактор разведения 4</i>

Внимание: Вода для ЛАЛ-теста, используемая для приготовления разведений, должна быть проверена на отсутствие эндотоксинов.

Пока вся эта информация вводится в прибор, происходит и предварительный нагрев вставленного картриджа (как минимум в течение 30 секунд).

#### 4. Добавление образца

После того, как вся необходимая для анализа информация введена в прибор, на дисплее появляется сообщение:

<i>ADD SAMPLE PRESS ENTER</i>	<i>Добавьте образец и нажмите кнопку «Ввод»</i>
-------------------------------	---

Добавьте 25 мкл в каждый из четырех резервуаров для образца и нажмите кнопку «Enter» на клавиатуре.

Анализ начинается, и для получения окончательных результатов потребуется 15-20 минут.

## РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА

По завершении определения ридер подает звуковой сигнал, означающий, что опыт окончен.

Результаты определения концентрации эндотоксина в положительных контролях испытуемого препарата (спайках) отображаются на дисплее прибора.

Spike #1 Recovery

Spike #2 Recovery

Spike #3 Recovery

Spike #4 Recovery

Содержание эндотоксина в положительных контролях испытуемого образца (в спайках), ЕЭ/мл

Эти данные попеременно отображаются на дисплее прибора до тех пор, пока не будет удален картридж. После завершения анализа и записи полученных результатов удалите картридж из прибора.

Внимание: После того, как будет выбрана необходимая пробоподготовка препарата, следует продолжить проведение валидации испытуемого препарата, используя соответствующие картриджи Endosafe с двумя каналами для испытуемого препарата и двумя каналами для положительного контроля испытуемого препарата.

### Дополнительные возможности по просмотру результатов:

Используйте ПО EndoScan-V для загрузки результатов и хранения данных анализов.

Загрузите результаты напрямую в Ваш компьютер и сохраните в выбранном Вами каталоге.

Используйте принтер Seiko DPU-414 или Epson TM-U 220D (может быть заказан в Charles River Endosafe) для печати результатов последнего опыта, результатов опытов от какой-либо даты или результаты всех сохраненных в памяти прибора опытов (в памяти могут быть сохранены результаты ста опытов).

## 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. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Dept. of Health & Human Services, FDA, December 1987.
8. Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. U.S. Dept. of Health and Human Services, FDA, July 15, 1991.
9. "Bacterial endotoxin test" <85>. In The U.S. Pharmacopeia, 26<sup>rd</sup> revision, p. 2023-6, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD., 2002
10. McCullough, K.Z. "Process Control: In-process and Raw Material Testing Using LAL." *Pharmaceutical Technology*, 12(5) p. 40 (1988).
11. Weary, M.E. "Understanding and setting endotoxin limits." *Journal of Parenteral Science and Technology*, 44:1., p. 16(1990).

PATENT INFORMATION

U.S. Patent No: US D472,324 S

U.S. Patent No: US 7,329,538 B2

Other Patents pending.

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