

Колонка редактора

Тема этого номера – методы проведения анализа. Чем больше мы занимались этим вопросом, тем очевиднее становилась необходимость в более подробном и детальном представлении официальных фармакопейных методов постановки теста. Действительно, почти исключительная приверженность гелъ-тромб тесту только отчасти объяснима его сравнительно невысокой стоимостью и простотой проведения. Использование только гелъ-тромб теста определяется не столько экономикой, сколько отсутствием доступной информации о других, возможно более совершенных и удобных методах проведения анализа. Конечно, мы ни в коем случае не собираемся урезать значения гелъ-тромб теста, он был и остается основным фармакопейным анализом. Но, как нам кажется, сегодня многие отечественные фармацевтические производства могли бы использовать, скажем, турбидиметрический или хромогенный тесты, а не используют они его по одной, очень простой причине – достоинства этих методов не известны. Мы собираемся восполнить этот пробел. Прекрасно понимаем, что одной-единственной обзорной статье будет недостаточно. Поэтому этим номером мы начинаем цикл статей, посвященных различным методам проведения ЛАЛ-теста. Скорее всего, эта программа превратится в постоянную рубрику, в которой мы будем рассматривать характеристики разных реактивов, приборов, программного обеспечения. Мы также надеемся привлечь к этой работе и специалистов тех организаций, которые уже используют в своей работе инструментальные методы проведения анализа.

С уважением, редакционная коллегия бюллетеня «ЛАЛ-тест».

Методы проведения анализа.

I. Природа реакции и общая характеристика методов.

Ситников А. Г.

Введение ЛАЛ-теста в Фармакопею США 20 издания в 1980 году стало началом официального использования ЛАЛ-теста. Событие это произошло не на пустом месте, все предыдущее десятилетие активно отрабатывались концепция применения метода и способы проведения реакции. Тогда же обсуждалась и необходимость стандартизации ЛАЛ-реактива, КСЭ, методов проведения анализа. Стандартизировать тогда, действительно, было что. Одних только компаний-производителей ЛАЛ-реактива было около десяти. Вариантов же проведения ЛАЛ-теста было больше двух десятков. Особенно много было микрометодов, в которых реакция проводилась в микрокапиллярах, на предметных или часовых стеклах. Простое перечисление всех этих методов может занять целую страницу, вот некоторые из них:

- Гелъ-тромб тест;
- Турбидиметрический тест (по конечной точке);
- Хромогенный тест (по конечной точке);
- Кинетический турбидиметрический тест;
- Колориметрический (определение белка по Лоури);
- Радиоизотопный (использование меченого коагулогена);
- Гелъ-тромб тест на предметных стеклах (микрометод);
- Гелъ-тромб тест на предметных стеклах, оценка результатов после высушивания реакционных смесей (микрометод);
- Гелъ-тромб тест на предметных стеклах с использованием микрокапилляров для оценки результатов реакции (микрометод);
- Гелъ-тромб тест на предметных стеклах, оценка результатов после окрашивания реакционных смесей (микрометод) и т.д.

Сегодня большая часть из предлагавшихся в середине 80-х годов способов проведения анализа уже забыта. Одни из них были слишком громоздкими или дорогими, как например, радиоизотопный или колориметрический. Микрометоды, при всей их внешней привлекательности, тоже не прижились как фармакопейные анализы. Слабой стороной микрометодов оказалось отсутствие четких и однозначных результатов, как, например, в пробирочном гель-тромб тесте. Другие методы напротив получили свое развитие, так хромогенный анализ оказался довольно популярным, и к анализу по конечной точке добавилась кинетическая модификация хромогенного анализа. Вообще, период от середины 70-х до середины 90-х годов был временем накопления практического опыта. Ошибки исправлялись, тупиковые и бесперспективные направления постепенно отпадали. Меньше стало и компаний-производителей ЛАЛ-реактива, остались профессионалы, прекрасно ориентирующиеся в вопросах производства и практического использования ЛАЛ-реактива.

В гармонизированной статье «Бактериальные эндотоксины», принятой в 2000 году Европейской Фармакопеей, Фармакопеями США и Японии, был подведен, возможно, промежуточный итог развитию методологии ЛАЛ-теста. В статью вошли 6 разных методов проведения анализа:

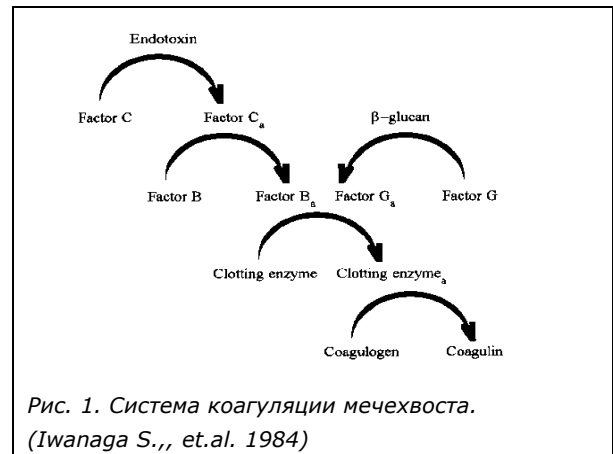
- **Метод А.**
Качественный гель-тромб тест;
- **Метод В.**
Количественный гель-тромб тест;
- **Метод С.**
Кинетический турбидиметрический тест;
- **Метод D.**
Кинетический хромогенный тест;
- **Метод E.**
Хромогенный тест по конечной точке;
- **Метод F.**
Турбидиметрический тест по конечной точке.

Каждый из этих методов имеет равные права и может быть использован для проведения контрольных анализов.

В первой части настоящей статьи мы подробно рассмотрим каждый метод и попытаемся оценить его достоинства и недостатки. Но прежде необходимо рассмотреть природу реакции ЛАЛ-реактива с ЛПС, без этого невозможно понимание сути различных способов регистрации содержания эндотоксина.

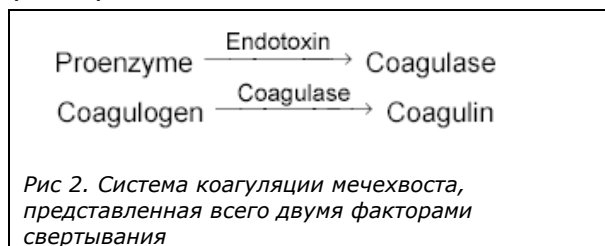
Система коагуляции мечехвостов очень похожа на системы коагуляции других животных и человека, но она имеет и отличия. Во-первых, все компоненты этой системы локализованы в клетках крови, в плазме

факторов свертывания нет. Во-вторых, кровь мечехвостов содержит один-единственный тип циркулирующих клеток – амебоциты или гранулярные гемоциты. Архаичная система коагуляции мечехвостов обладает еще одной особенностью – реакция коагуляции инициируется только эндотоксинами грамотрицательных бактерий. Сочетание всех этих факторов и предопределило счастливую возможность использования реакции коагуляции мечехвостов *in vitro* для определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий.



На сегодняшний день все факторы коагуляции мечехвостов хорошо изучены и описаны. Система коагуляции состоит из пяти ферментов и белка-субстрата (Рис.1). Три фермента – Фактор С, Фактор В и Профермент составляют каскад свертывания, запускаемый эндотоксинами. Присутствие в лизате Фактора G определяет наличие альтернативного пути, который запускается β-глюканами. Конечный результат активации системы свертывания – переработка активным свертывающим ферментом белка-субстрата коагулогена. Коагулоген разрезается на несколько субъединиц, которые затем полимеризуются, образуя гель. Результат этой ферментативной реакции зависит от температуры, значения рН, концентрации ионов в реакционной смеси, времени проведения реакции и, самое главное, от концентрации эндотоксинов. Чем выше концентрация эндотоксина, тем активнее ферментная система, и тем быстрее происходит образование геля. Именно по этому все способы проведения ЛАЛ-теста так или иначе связаны с измерением активности ферментной системы, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна концентрации эндотоксина. Если быть точным, то речь идет об измерении активности свертывающего фермента – последнего фермента в каскаде. Наверное, поэтому в современной литературе и инструкциях можно встретить устаревшее представление о системе свертывания мечехвостов, состоящей всего из двух факторов: фермента

(профермента) и субстрата (коагулогена) (Рис. 2).

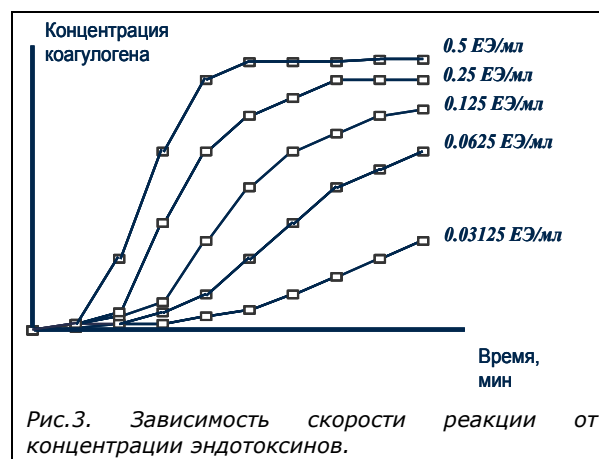
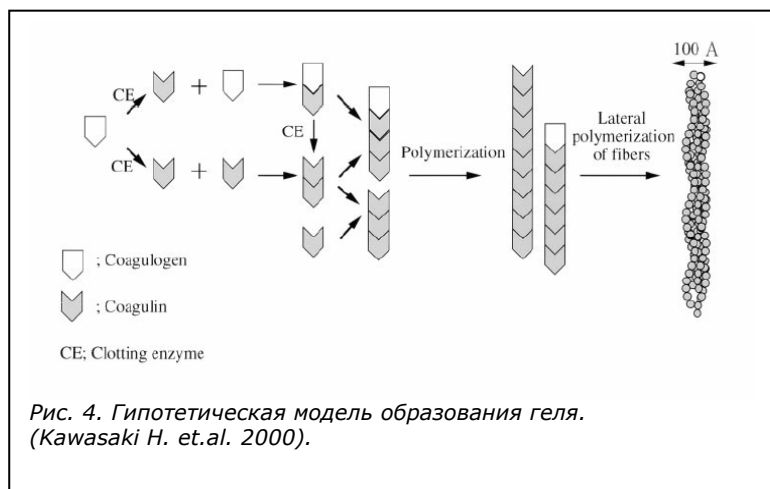


Активность фермента может быть измерена в конце predetermined периода инкубирования. На этом принципе основаны методы, определяющие конечную точку реакции. Это оба варианта проведения гель-тромб теста, а также хромогенный и турбидиметрический анализы по конечной точке. Кинетические анализы основаны на измерении скорости активации этого фермента. Зависимость скорости реакции от концентрации эндотоксинов приведена на Рис.3. Чем выше концентрация эндотоксина, тем активнее ферментная система, тем меньше надо времени для переработки субстрата, тем круче кривая реакции. Можно также заметить, что рано или поздно весь субстрат, находящийся в лизате, будет переработан. Именно поэтому, все анализы, в которых проводится определение конечной точки реакции, имеют жесткие временные интервалы инкубирования.

Рассмотрим основные черты каждого из официальных фармакопейных методов.

Гель-тромб тест (Методы А и В).

Самый простой и самый известный из всех методов, в точности повторяющий реакцию коагуляции мечехвоста *in vitro*. ЛАЛ-реактив для гель-тромб теста - это вся ферментная система мечехвоста практически без каких-либо «переделок». В присутствии достаточного количества эндотоксина реакция доводится до логического конца - образования геля. Современное представление о процессе полимеризации коагулогена представлено на Рис. 4.



Коагулоген разрезается на несколько субъединиц, которые объединяются между собой, образуя сначала длинные нити коагулина, далее эти нити за счет латеральной полимеризации образуют пространственную решетку геля. Чувствительность ферментной системы доводится производителем реактива до заданного значения, и эта чувствительность соответствует минимальной концентрации эндотоксина, с которой способен реагировать ЛАЛ-реактив в стандартных условиях проведения анализа. Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива определяет и чувствительность метода. Реактивы с максимальной чувствительностью позволяют определить концентрацию эндотоксина, равную 0,03 ЕЭ/мл. Компания **Charles River Endosafe** выпускает реактив для гель-тромб теста с чувствительностью, равной 0,015 ЕЭ/мл. Впрочем, такой реактив может считаться промежуточным звеном между гель-тромб тестом и инструментальными анализами, практическая чувствительность которых не на много больше.

Обе модификации гель-тромб теста являются анализами по конечной точке реакции.

Метод А. Качественный гель-тромб тест.

Это наиболее простой и экономичный метод проведения анализа. Для его проведения смешивают равные количества ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата, затем реакционные смеси инкубируют 60 мин при температуре 37°C. Если в результате реакции получается твердый гель, то результат называется положительным и означает, что концентрация эндотоксина равна или более чувствительности ЛАЛ-реактива. Если гель не образуется, то результат отрицательный, и это означает, что концентрация эндотоксина менее чувствительности ЛАЛ-реактива.

Часто при первоначальном

освоении метода возникают проблемы теоретического порядка. Некоторый парадокс качественного анализа заключается в том, что результаты могут быть интерпретированы только как «больше или равно» или «меньше». Желаемый результат анализа естественно «меньше», т.е. демонстрация отсутствия эндотоксина (точнее демонстрация того, что концентрация эндотоксина ниже ожидаемой). Вот и приходится при расчете степени разведения испытуемого препарата использовать в качестве отправной цифры такую концентрацию эндотоксина, которой в препарате не должно быть. Чем-то это напоминает поиски черной кошки в черной комнате.

Впрочем, данное обстоятельство нельзя назвать серьезным недостатком метода. Достоинствами же этого анализа являются простота проведения, минимум необходимого оборудования, хорошая воспроизводимость результатов. Ограничением метода является невозможность количественного определения концентрации эндотоксинов.

Метод В. Количественный гель-тромб тест. Для определения концентрации эндотоксина препарат последовательно разводят водой. Исходная концентрация эндотоксина в препарате постепенно снижается и, наконец, становится меньше чувствительности ЛАЛ-реактива. В опыте все разведения, в которых концентрация эндотоксина больше или равна чувствительности ЛАЛ-реактива, дают твердый гель. Разведения, в которых концентрация ниже, дают отрицательные результаты. Картина опыта может выглядеть следующим образом:

Разведения испытуемого препарата						
1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-

По этим результатам видно, что в исходном растворе концентрация эндотоксина была больше чувствительности ЛАЛ-реактива, а в разведении 1/8 она стала равна чувствительности ЛАЛ-реактива. Следовательно, можно считать, что в исходном растворе концентрация эндотоксина была в восемь раз больше чувствительности ЛАЛ-реактива. Зная значение чувствительности, нетрудно рассчитать, чему равняется концентрация эндотоксина в препарате. Для этого фактор разведения (8) надо умножить на чувствительность (λ). В количественном анализе последнее разведение, в котором получен плотный гель (в примере это разведение 1/8), называют конечной точкой реакции для проверяемой серии разведений. Следует помнить, что это частное определение, а вообще гель-тромб

тест (и качественный, и количественный) - это всегда анализ по конечной точке, т.е. в определенное время реакция останавливается, после чего регистрируются результаты анализа.

Количественный гель-тромб тест не обеспечивает высокой точности определения концентрации эндотоксинов. Допустимая ошибка метода составляет 50-200% от определенной величины. Т.е. реальная концентрация эндотоксинов в препарате может быть вдвое больше или вдвое меньше определенного в анализе значения. Поэтому в Европейской фармакопее **Метод В** называется полуколичественным анализом. Кстати сказать, полуколичественным является гель-тромб тест вообще вне зависимости от метода постановки анализа. Легко заметить, что Методы А и В очень похожи и принципиально друг от друга не отличаются. И деление на количественный и качественный анализ появилось сравнительно поздно. Первоначально гель-тромб тест рассматривался именно в редакции сегодняшнего Метода В, т.е. количественного анализа.

Количественный гель-тромб тест достаточно широко используется в научно-исследовательских работах. В то же время ценность этого анализа, как фармакопейного метода, не очень высока, поскольку он требует более длительной подготовки к анализу, и для его проведения необходимы значительные количества ЛАЛ-реактива. Для контрольного анализа вполне достаточно качественного ответа, и совсем необязательно знать, насколько концентрация эндотоксина выше или ниже установленной нормы.

Этот анализ является наиболее простым и доступным из всех способов количественного определения эндотоксинов. Он не требует ни специальной подготовки, ни специального оборудования. В ситуации, когда необходимо узнать концентрацию эндотоксина, проще всего поставить именно количественный гель-тромб тест. К ограничениям метода можно отнести невысокую точность определения концентрации эндотоксинов и необходимость постановки опыта для серии разведений, что приводит к большому расходу реактива.

Инструментальные методы проведения анализа.

Прежде чем детально разбирать особенности каждого из инструментальных методов, хочется обратить внимание на некоторые общие свойства, принципиально отличающие любой инструментальный анализ от гель-тромб теста.

Первое - все эти методы количественные и точность определения концентрации эндотоксинов у них значительно выше, чем у гель-тромб теста.

Второе – чувствительность методов или минимальная определяемая концентрация эндотоксинов может быть, как минимум, на порядок выше чувствительности гель-тромб теста.

Третье – многие инструментальные методы дают возможность определения концентрации в достаточно широком диапазоне. Определенные модификации инструментальных методов позволяют определить концентрацию эндотоксина в ряду от 0,001 ЕЭ/мл до 100 ЕЭ/мл (вопрос в том, насколько часто используется столь широкий диапазон, заслуживает отдельного рассмотрения). Это в частности означает, что для количественного определения эндотоксинов в препарате нет необходимости проверять серию его разведений. Одноединственного разведения препарата достаточно для получения количественного результата.

И, наконец, еще одна особенность этих методов – диапазон определяемых концентраций эндотоксина и максимальная чувствительность метода задаются непосредственно пользователем при построении калибровочной кривой. В гель-тромб тесте изменение чувствительности ЛАЛ-реактива невозможно (точнее такая возможность не рассматривается).

Турбидиметрические анализы (Методы F и C).

Турбидиметрический тест можно в какой-то мере считать инструментальной версией гель-тромб теста. Для проведения этого анализа используется реактив, в принципе не отличающийся от реактива, используемого для гель-тромб теста. Соответственно и природа реакции та же, и конечный результат может быть таким же, т.е. образованием твердого геля. Однако реакция до конца не доводится. Предметом измерения является промежуточная стадия реакции, сопровождающаяся увеличением мутности реакционной смеси. Английское название метода: **Turbidimetric assay** (*turbid* – мутный, густой). Подобную картину можно наблюдать при постановке гель-тромб теста, когда гель за час не образовался, но раствор в пробирках мутный, густой, могут быть видны отдельные комки. Такое состояние реакционной смеси называют «кашей», и свидетельствует оно о том, что концентрация эндотоксинов близка к чувствительности ЛАЛ-реактива. Очевидно также, что визуально оценить интенсивность помутнения невозможно, для этой цели нужен прибор. Анализ, также как и гель-тромб тест, может быть проведен в стеклянных пробирках, в этом случае используются специальные приборы, например, **LAL-5000** (*Associates of Cape Code*). Не менее распространен и вариант проведения анализа в пластиковых

микропланшетах с использованием универсальных спектрофотометров (ридеров) для микропланшет.

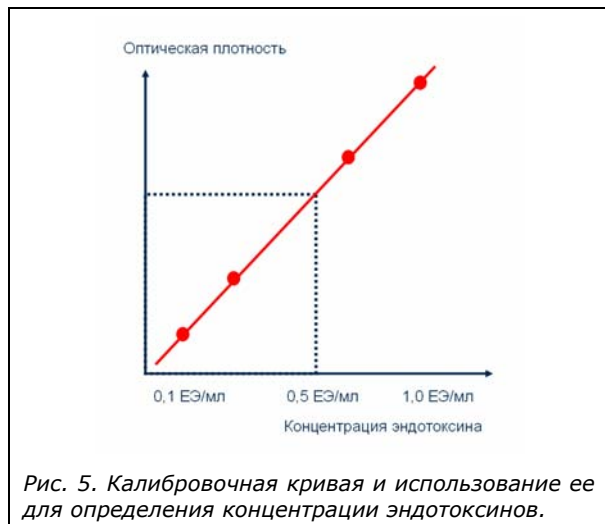
Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.

Анализ по конечной точке проводят в два этапа: сначала инкубируют реакционную смесь, затем измеряют оптическую плотность. Степень помутнения реакционной смеси прямо пропорциональна активности свертывающего фермента и, соответственно, содержанию эндотоксинов. Измерения делают при длине волны ниже 405 нм, обычно 340-350 нм. Калибровочная кривая строится по трем-четырем известным концентрациям КСЭ, Рис. 5. Если при проверке испытуемого образца значение оптической плотности укладывается в диапазон, определенный калибровочной кривой, можно рассчитать значение концентрации эндотоксинов в препарате. Чувствительность метода и измеряемый диапазон концентраций эндотоксинов зависят от времени инкубирования. Более длительное инкубирование позволяет определять концентрации эндотоксина, близкие к 0,001 ЕЭ/мл. Отношение наименьшей и наибольшей концентрации эндотоксина в определяемом диапазоне примерно 1:10, например, от 0,1 ЕЭ/мл до 1,0 ЕЭ/мл или от 0,5 ЕЭ/мл до 5,0 ЕЭ/мл. Если содержание эндотоксинов ниже или выше выбранного диапазона, оценка результатов анализа аналогична оценке результатов гель-тромб теста с той лишь разницей, что в гель-тромб тесте «меньше» или «больше» относится к единственной концентрации – значению чувствительности реактива, а в этом анализе «меньше» будет означать – менее нижней границы диапазона, а «больше» – более верхней границы измеряемого диапазона.

К достоинствам метода можно отнести то, что анализ может быть проведен на приборах без специальных инкубационных блоков, и для расчета результатов не нужно специального программного обеспечения. Но у этого метода есть и совершенно очевидные ограничения. Главной проблемой является невозможность остановить реакцию в заданное время. Это чисто техническая проблема, поскольку интервал времени, за который надо успеть провести измерение, очень ограничен. Повторно снять показания тоже не удастся. Это обстоятельство, пожалуй, и является основным недостатком метода, именно поэтому метод используется очень редко (если используется вообще). К недостаткам можно отнести и ограниченный диапазон определяемых концентраций, впрочем, это органическое свойство любого инструментального анализа по конечной точке.

Метод С. Кинетический турбидиметрический тест.

В кинетическом турбидиметрическом анализе также измеряется степень помутнения реакционной смеси. Однако в этом анализе важным является скорость изменения оптической плотности реакционной смеси. Если обратиться к схематичному представлению кинетики реакции на Рис. 3, легко заметить, что для более высоких концентраций эндотоксинов реакция идет быстрее. В основу кинетического метода положено измерение именно скорости реакции, точнее времени, необходимого для достижения заранее определенного (порогового) значения оптической плотности. Для проведения такой реакции необходимы приборы, которые позволяют одновременно инкубировать реакционные смеси и измерять их оптическую плотность. При проведении анализа считывание результатов проводится по каждой пробирке или лунке микропланшета через постоянные интервалы времени.



Измерения продолжаются до достижения значения пороговой оптической плотности. Общее время проведения анализа обычно 60 мин, в отдельных пробах, в которых содержание эндотоксинов высокое, результаты могут быть получены гораздо раньше. Калибровочная кривая строится по нескольким концентрациям КСЭ. Измеряемый диапазон концентрации кинетического турбидиметрического метода очень широк, он может быть от 0,001 ЕЭ/мл до 100 ЕЭ/мл. Впрочем, такие широкие рамки, как правило, и не нужны, к тому же при меньшем разбросе концентрации точность определения выше. Функции измерения выполняет прибор, например, ридер или спектрофотометр, полученные данные обрабатываются специальными компьютерными программами. Фактически для проведения анализа используется сложный комплекс, состоящий

из спектрофотометра, компьютера, программного обеспечения и принтера.

К достоинствам метода можно отнести очень широкий диапазон измерений и высокую чувствительность, кинетический турбидиметрический анализ считается наиболее чувствительным методом определения эндотоксинов. Аппаратное и программное обеспечение тоже можно отнести к достоинствам метода. Прибор контролирует температуру и время инкубирования. Программное обеспечение позволяет автоматизировать процедуру оценки и интерпретации результатов, программа автоматически генерирует протоколы анализа. Все полученные данные хранятся в виде архива. Эти достоинства имеют и обратную сторону, а именно, сравнительно высокую стоимость приборов и программ. Первоначальное освоение метода и программного обеспечения представляется несколько более сложным делом, чем освоение гель-тромб теста.

Хромогенные анализы (Методы Е и D).

ЛАЛ-реактив, предназначенный для проведения хромогенного анализа, значительно отличается от реактивов, предназначенных для проведения гель-тромб теста и турбидиметрического теста. В этом реактиве естественный субстрат - коагулоген заменен на искусственный хромогенный субстрат. Этот субстрат состоит из полипептидной цепочки и хромофора р-нитроанилина (рНА). Типичная структура хромогенного субстрата представлена на Рис. 6.



Рис. 6. Структура хромогенного субстрата.

Аминокислотная последовательность полипептида аналогична аминокислотной последовательности коагулогена, предшествующей разрезаемой свертывающим ферментом связи. Поэтому активный свертывающий фермент «по ошибке» разрезает эту связь, высвобождая хромофор р-нитроанилин, в результате чего в растворе развивается желтое окрашивание. Интактный же хромогенный субстрат бесцветен. Интенсивность окрашивания пропорциональна активности свертывающего фермента, которая в свою очередь зависит от концентрации эндотоксина. Максимум поглощения р-нитроанилина лежит в ультрафиолетовой области, однако оптическую плотность реакционной смеси обычно измеряют при длине волны 405 нм. Это связано с тем, что в близком ультрафиолете находятся максимумы поглощения многих соединений, поэтому оценка результатов анализа может быть затруднительна.

Хромогенный анализ проводится двумя методами, и для каждого из них предназначены специальные ЛАЛ-реактивы.

Метод Е. Хромогенный тест по конечной точке.

Как и все анализы по конечной точке хромогенный анализ проводится в два этапа: сначала проводится инкубирование, затем оценка результатов. Но в отличие от турбидиметрического анализа в данном анализе реакцию можно принудительно остановить и, следовательно, измерение не обязательно проводить немедленно. Это означает, что инкубирование и измерение оптической плотности может быть проведено на разном оборудовании, и для проведения измерения необязательно использование сложных приборов, оснащенных модулем инкубирования. Правда, процедура проведения анализа не очень проста. Обычно она складывается из нескольких этапов, жестко регламентированных по времени и связанных между собой. Последовательность может быть следующей:

1. Преинкубирование испытуемых и контрольных растворов;
2. Добавление ЛАЛ-реактива и инкубирование реакционных смесей;
3. Добавление к реакционным смесям хромогенного субстрата, продолжение инкубирования;
4. Остановка реакции;
5. Измерение оптической плотности.

До остановки реакции временные интервалы каждого этапа очень важны, от них зависит чувствительность опыта. Как правило, более длительное инкубирование позволяет определять более низкие концентрации эндотоксина.

Концентрацию эндотоксина можно рассчитать по калибровочной кривой, которая строится по нескольким концентрациям контрольного стандарта. Минимальная концентрация эндотоксина, которую можно определить с помощью хромогенного метода по конечной точке, составляет 0,005 ЕЭ/мл. Диапазон измеряемых концентраций и чувствительность определения задаются пользователем при построении калибровочной кривой. Как уже упоминалось выше, для всех анализов по конечной точке характерен не очень широкий диапазон измеряемых концентраций, обычно отношение минимальной и максимальной концентрации составляет 1:10. Другими словами, в конкретном опыте можно обнаружить эндотоксин в концентрации от 0,005 ЕЭ/мл до 0,05 ЕЭ/мл или от 0,01 ЕЭ/мл до 0,1 ЕЭ/мл и т.д.

Существует интересная модификация этого теста, в которой после остановки

реакции высвободившийся пара-нитроанилин переводится в N-(1-нафтил-4-диазо-4-нитробензол) этилендиамин, который имеет ярко-красное окрашивание с максимумом поглощения при 545 нм. Этот способ позволяет не только увеличить чувствительность метода, но и дает возможность проверять образцы, имеющие желтое окрашивание.

Пожалуй, главным достоинством хромогенного анализа по конечной точке является простая процедура оценки результатов. Для расчета концентрации эндотоксина можно использовать калькулятор, электронные таблицы (MSExcel), а можно построить простую калибровочную кривую на миллиметровке. К недостаткам метода можно отнести достаточно сложную процедуру проведения реакции. В принципе этот анализ можно проводить и с реактивом, предназначенным для кинетического хромогенного анализа, в котором ЛАЛ-реактив лиофилизирован вместе с хромогенным субстратом. В этом случае процедура анализа значительно упрощается и включает только инкубирование образцов с ЛАЛ-реактивом и принудительную остановку реакции.

Метод D. Кинетический хромогенный тест.

В кинетическом хромогенном тесте инкубирование реакционных смесей и считывание результатов проводится одновременно. ЛАЛ-реактив, используемый для проведения этого анализа, содержит искусственный хромогенный субстрат. Поскольку считывание результатов проводится в ходе реакции, в принудительной остановке реакции нет необходимости. По сути этот анализ ни чем не отличается от кинетического турбидиметрического теста, хотя для его проведения используют другой реактив, и измерения делаются при другой длине волны.

Для проведения анализа необходимо специальное оборудование и программное обеспечение. Анализ практически всегда проводится на микропланшетах, в этом случае используется спектрофотометр Bio-Tek ELx808 или аналогичный.

Для учета и обработки результатов необходимо программное обеспечение. Калибровочная кривая строится по нескольким точкам, диапазон измерения может быть очень широким от 0,005 ЕЭ/мл до 50 ЕЭ/мл (Рис. 7).

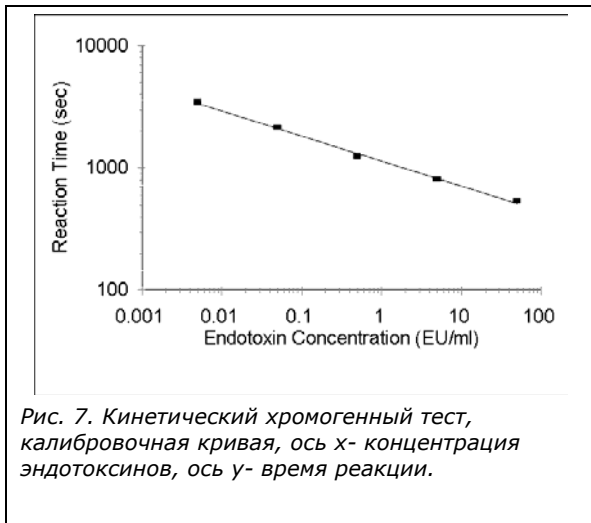


Рис. 7. Кинетический хромогенный тест, калибровочная кривая, ось x- концентрация эндотоксинов, ось y- время реакции.

К достоинствам метода можно отнести широкий диапазон измеряемых в анализе концентраций, высокую чувствительность к эндотоксинам, возможность автоматизации процедуры проведения анализа и обработки результатов, связанную с использованием специализированного оборудования и программ. Впрочем, последнее можно отнести и к недостаткам, поскольку стоимость такого измерительного комплекса может быть достаточно высокой.

Литература.

Bacterial endotoxins, 2.6.14., *European Pharmacopoeia*, III Ed., Strasbourg France. Supp. 2001.

The United States Pharmacopoeia, 24-th Ed. Suppl. 2. 2000.

Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. U.S. Department of Health and Human Services,

Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

Interim guideline for human and veterinary drug products and biologicals: Kinetic LAL techniques. Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1991.

Iwanaga S., Morita T., Nakamura T., Hiranaga M., Ohtsubo S. *The Limulus coagulation system sensitive to bacterial endotoxins*. In: *Bacterial endotoxin. Chemical, Biological and Clinical Aspects*. Homma J.Y., Luderitz O., Westphal (eds). Verlag Chemie Heidelberg 1984. P. 365-392.

Dawson M.E. *A wealth of options. Choosing an LAL test method*. LALUpdate. 1995., V.13., No.3.

Kawasaki H., Nose T., Muta T., et al. *Head-to-Tail Polymerization of Coagulin, a Clottable Protein of the Horseshoe Crab*. *J. Biol. Chem.* 2000., Vol. 275, No. 45, pp. 35297-35301.

Novitsky T.J. *Diazo-coupling option with Pyrochrome chromogenic LAL*. LALUpdate. 1998., Vol. 16., No. 2.

Tsuji K., Martin P. A., Bussey D. M. *Automation of chromogenic substrate Limulus amoebocyte lysate assay method for endotoxin by robotic system* *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, Vol. 48. No. 3 p. 550-555

Novitsky T.J. *Discovery to commercialization: The blood of the horseshoe crab*. *Oceanus*. 1984. Vol. 27, N. 1, P. 13-18

Novitsky T.J. *Choosing a method*. LAL Update, 1983, Vol.1., No.1

Lindsay G.K., Roslansky P.F., Novitsky T.J. *Single-step, chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin*. *J. Clin. Microbiol.* 1989. Vol.27., No. 5., P.947-951.

«ЛАЛ-тест» - периодический бюллетень для специалистов, работающих в области фармации, медицины и биологии.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» выходит с периодичностью 4 раза в год.

Для оформления подписки просим отправлять заявки по почте:

ООО «ЛАЛ-Центр»

117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3а,
Тел.: (495) 517-40-37, факс: (495) 742-83-49,
E-mail: LALNews@Limulustest.ru

Бюллетень зарегистрирован в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации № 77-16115 от 11.08.03 г.

Главный редактор: Ситников А.Г.

Редакционная коллегия: Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Чиркова М.Н., Демидова В.В.

Подписано к печати: 23.06.2006 г.

Формат: А4; Бумага: супербелый лен 90 г/м²; Печать: Офсет; Объем: 8 стр.;

Тираж: 300 экземпляров.

Отпечатано в типографии ООО «Формула Цвета», Москва.



ЛАЛ-ЦЕНТР

О П Р Е Д Е Л Е Н И Е
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ