

**РАСТВОР ЭНДОТОКСИН-СПЕЦИФИЧНОГО БУФЕРА (КАРБОКСИМЕТИЛИРОВАННОГО КУРДЛАНА)****НАЗНАЧЕНИЕ**

Раствор эндотоксин-специфичного буфера служит вспомогательным материалом при определении эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста. Его назначением к использованию является блокировка вмешательства  $\beta$ -D-гликанов и материалов, реагирующих с ЛАЛ-реактивом (LAL-Reactive Material, LAL-RM) во время проведения ЛАЛ-теста (1). Руководство FDA по проведению ЛАЛ-теста позволяет использовать вспомогательные материалы для преодоления влияния мешающих факторов (3).

**ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА**

ЛАЛ-тест является наиболее чувствительным и специфичным методом обнаружения и измерения содержания бактериальных эндотоксинов. Реакция ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата – это ферментативный процесс, для которого требуется нейтральное значение pH реакционной среды и соответствующий баланс одно- и двухвалентных катионов (2,3). ЛАЛ-тест считался специфичным по отношению к эндотоксинам до тех пор, пока не было показано, что  $\beta$ -D-гликаны, известные как LAL-RM, активируют данную реакцию через альтернативный ферментный путь (4,5). Обычными источниками этого полимера глюкозы являются клеточные стенки дрожжевых клеток или материалы содержащие целлюлозу, такие как полые мембраны. Дополнительную сложность привносит тот факт, что коммерчески доступные ЛАЛ-реактивы значительно различаются между собой по способности реагировать с LAL-RM (2,6). Это может ставить под сомнение специфичность метода, а так же являться причиной плохой сходимости результатов анализа между различными лабораториями.

В настоящее время нет однозначного представления о степени патологического воздействие гликанов на организм человека, однако известно, что пациенты во время процедуры гемодиализа подвергаются воздействию LAL-RM без видимых серьезных последствий (2,6). Для того, чтобы определить и удалить источники ложно-положительных результатов и объяснить случаи получения противоречивых данных, целесообразно использовать ЛАЛ-реактив, чувствительный к гликанам. В случае если подозревается влияние LAL-RM, испытуемые материалы могут быть проверены с помощью блокатора гликанов и без него для того, чтобы определить, присутствуют ли гликаны в испытуемом образце. С другой стороны, если ранее уже было показано, что испытуемый препарат может вызывать неспецифическую реакцию ЛАЛ-реактива, то следует сразу использовать блокатор гликанов для снятия данной неспецифической активности (7,8). В том случае, если есть подозрение на присутствие гликанов, более целесообразным считается использование кинетических методов, так как в кинетических анализах эндотоксины и гликаны реагируют синергически, вызывая усиление реакции в положительном контроле испытуемого препарата. Таким образом, в результате данного синергизма в положительном контроле будут получены такие результаты, по которым анализ будет оценен как недостоверный, но препарат не будет забракован из-за мнимого превышения содержания эндотоксинов (2). В этом случае для перепроверки результатов следует переставить опыт, используя эндотоксин-специфичный буфер.

**СОСТАВ**

Каждый флакон содержит 5,2 мл карбоксиметилированного курдлана (КМ-курдлана) в буферном растворе, содержащем Трис (гидроксиметил) аминометан со значением pH 7,4. Буфер стерилен и свободен от эндотоксинов.

**ОБЩИЕ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

1. Только для использования in-vitro.
2. Данный реактив следует использовать только для разведения ЛАЛ-реактива Endosafe®.
3. Не используйте данный реактив, если он не является бесцветным и прозрачным.
4. Эндотоксин-специфичный буфер содержит большое количество КМ-курдлана, который является  $\beta$ -D-гликаном. Присутствуя в высокой концентрации, КМ-курдалан действует как блокатор гликанов (1). Однако в низкой концентрации КМ-курдлан обладает высокой реакционной способностью с ЛАЛ-реактивом. Избегайте контакта ES-буфера с испытуемыми образцами, стерильной посудой, водой для ЛАЛ-теста, пипетками и т.д.
5. При использовании ES-буфера для разведения ЛАЛ-реактива для хромогенного анализа по конечной точке для остановки реакции должен быть использован раствор, отличный от раствора уксусной кислоты.

## УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Хранить при температуре 2 - 8°C. Не замораживать.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Использование в рутинных анализах.

1. При анализе образцов, для которых уже установлено присутствие  $\beta$ -D-гликанов или LAL-RM, использование ES-буфера для разведения ЛАЛ-реактива позволяет проводить ЛАЛ-тест с наиболее высокой специфичностью к эндотоксинам.

2. При анализе образцов, для которых причиной получения положительных результатов могут являться эндотоксины, и/или гликаны, вначале следует провести анализ, используя ЛАЛ-реактив, разведенный водой для ЛАЛ-теста. Затем следует проверить тот же образец, используя ЛАЛ-реактив, разведенный с помощью ES-буфера.

3. При сравнении результатов обоих анализов должна наблюдаться значительная разница. В случае, если испытуемый образец содержит  $\beta$ -гликаны, значения содержания эндотоксинов, полученные в анализе с использованием реактива, разведенного водой для ЛАЛ-теста, будут выше, чем в анализе с использованием ES-буфера.

4. Заключение, о том, что испытуемый образец не содержит эндотоксинов, может быть сделано в том случае, если результаты анализа, проведенного с использованием ES-буфера, укладываются в допустимые значения при условии соответствия норме всех прочих критериев анализа.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Tsuchiya, M, Takakoka A., Tokioka, N, Matsura S. Development of an endotoxin-specific Limulus Amebocyte Lysate test blocking  $\beta$ -Glucan-mediated pathway by carboxymethylated curdlan and its application. Jpn.J. Bacteriol., 45, 903-911 (1990).

2. Cooper J. M. Weary and F. Jordan "The impact of non-endotoxin LAL-Reactive materials on Limulus amebocyte lysate analyses" submitted to PDA J. Parent. Sci. & Tech. (1996)/

3. 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.

4. Kakinuma A, Asano, T., Torii, H., Sugino Y. Gelation of Limulus amebocyte lysate by an antitumor (1-3)- $\beta$ -D-Glucan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 434-439 (1981).

5. Morita T. "A new (1-3)- $\beta$ -D-Glucan-mediated coagulation pathway found in Limulus amebocytes. FEBS Lett 129, 318-321.

6. Roslansky P.F. & T. Novitsky. "Sensitivity of Limulus Amebocyte Lysate to LAL-Reactive Glucans". J.Clin. Micro 29 2477-83 (1991).

7. United States Patent No. 5,179,006. Title of invention: Process for measuring endotoxin. Inventors: Shuji Matsuura, Masakazu Tsuchiya. Assignce: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan.

8. European Patent No. 330991. Title of invention: Inventors and proprietor are the same as U.S.Patent.

### ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.  
1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku,  
Osaka 541, Japan

### ПОСТАВЩИК:

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