

ЛИЗАТ АМЕБОЦИТОВ LIMULUS

ENDOSAFE® ENDOCHROME-K

ФЛАКОН ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ (ПИРОГЕНОВ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Лизат амебоцитов Limulus (ЛАЛ-реактив), лиофилизированный вместе с хромогенным субстратом, предназначен для количественного определения содержания эндотоксинов с помощью кинетического хромогенного метода

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ЛАЛ-тест является наиболее чувствительным и высокоспецифичным способом оценки содержания бактериальных эндотоксинов - фрагментов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которые являются наиболее известными пирогенами. Основой метода является легко распознаваемое помутнение и гелирование ЛАЛ-реактива, происходящее под действием эндотоксинов (1,5). Простота и экономичность ЛАЛ-теста позволяют использовать его в качестве средства внутрипроизводственного контроля, контроля качества сырья и готовых лекарственных средств, изделий медицинского назначения (6). В статье «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США описаны способы валидации ЛАЛ-теста, позволяющие использовать его вместо анализа на кроликах (9).

С помощью ридера для микропланшет или ридера для пробирок может быть проведен кинетический хромогенный анализ. В этом анализе проводится точное измерение интенсивности окрашивания реакционной смеси. Время изменения степени окрашивания обратно пропорционально количеству эндотоксина в образце, концентрацию эндотоксина в неизвестном образце можно определить по калибровочной кривой. В кинетических анализах значение λ соответствует наименьшей из концентраций, по которым построена калибровочная кривая.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ

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 инициируется пирогенами (бактериальными эндотоксинами), которые запускают ферментативную реакцию, приводящую к увеличению интенсивности окрашивания реакционной смеси и ее гелированию.

При анализе с бесцветным хромогенным субстратом результатом ферментативной реакции является развитие желтого окрашивания реакционной смеси, происходящее вследствие высвобождения хромофора, р-нитроанилина (pNA). Количество высвобожденного pNA можно измерить спектрофотометрически.

РЕАКТИВЫ

ЛАЛ-реактив: лиофилизированный ЛАЛ-реактив Endosafe®Endochrome-K содержит искусственный хромогенный субстрат, лизат амебоцитов Limulus, одно- и двухвалентные катионы и буфер.

Разведение: собирают содержимое флакона на дне, аккуратно постукивая флаконом по твердой поверхности. ЛАЛ-реактив разводят непосредственно перед использованием. Аккуратно, стараясь не привнести загрязнений, приподнимают пробку для того, чтобы погасить вакуум. Небольшие количества порошка, остающиеся на пробке, не оказывают влияния на дальнейшие анализы. Для разведения ЛАЛ-реактива с помощью пипетки добавляют во флакон с ЛАЛ-реактивом 3,2-3,4 мл воды для ЛАЛ-теста или буфера для разведения Endosafe®. Пробку отбрасывают. В том случае, если флакон с реактивом не будет немедленно использован, его закрывают пленкой Парафилм®, внутренняя поверхность которой может считаться апиrogenной. Аккуратно перемешивают содержимое флакона до полного растворения реактива. Раствор реактива бесцветный. Не следует использовать флаконы в случае нарушения укупорки или в том случае, если после разведения наблюдается окрашивание или опалесценция раствора.

Хранение: Лиофилизированный ЛАЛ-реактив относительно стабилен, его следует хранить при температуре 2-25°C, следует избегать воздействия температур выше 25°C. Разведенный ЛАЛ-

реактив в процессе работы хранят на холодной поверхности или в холодильнике при температуре 2-8° С до 24 часов. В остальных случаях ЛАЛ-реактив хранят при температуре ниже -20°С в течение двух недель после его разведения и замораживания. ЛАЛ-реактив можно замораживать и размораживать только один раз.

Контрольный стандарт эндотоксина *E.coli* (КСЭ) поставляется компанией Charles River Endosafe и используется для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива, валидации метода и для постановки контролей (положительного контроля и положительного контроля испытуемого образца). Активность стандарта, правила его разведения и хранения указаны в Сертификате Анализа.

Вода для ЛАЛ-теста (не содержащая эндотоксинов) используется для разведения ЛАЛ-реактива, подготовки испытуемых растворов, контролей и для разведения стандарта эндотоксина (9).

ОБЩИЕ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ЛАЛ-реактив Endosafe® Endochrome-K предназначен только для диагностики in vitro. При работе с ЛАЛ-реактивом необходимо соблюдать осторожность, поскольку его токсичность не исследовалась.

Для правильного выполнения процедуры анализа следует строго придерживаться всех пунктов инструкции. Для проверки возможности ингибирования в анализ следует включать положительные контроли. Все материалы, контактирующие с испытуемыми образцами, должны быть апиrogenны. Стеклопосуда должна быть депирогенизирована в соответствии с валидированной процедурой, например, не менее трех часов при температуре 200°С. Материалы, которые невозможно подвергнуть тепловой депирогенизации или которые не имеют маркировки «не содержат эндотоксинов», должны быть проверены перед использованием в анализе.

ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Все материалы и растворители, контактирующие с испытуемым образцом, не должны содержать эндотоксинов. Следует использовать технику асептической работы. Реакция ЛАЛ-реактива с эндотоксином зависит от значения рН, и это значение для реакционной смеси должно быть от 6,5 до 8,0. Если необходимо, рН доводят с помощью не содержащего эндотоксинов Трис буфера (поставляется Endosafe). Не следует доводить рН растворов, имеющих низкую буферную емкость, поскольку ЛАЛ-реактив Endosafe® Endochrome-K содержит буфер.

ФАКТОРЫ, МЕШАЮЩИЕ РЕАКЦИИ

Анализ может быть валидирован для любого образца, если будет показано, что он не содержит факторов, мешающих реакции. 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 (положительный контроль) (8).

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 (9). В Фармакопее США указаны специфические значения предельного содержания для конкретных лекарственных препаратов. (9) Эти значения должны использоваться для расчета степени разведения испытуемого препарата, которое может быть сделано для преодоления ингибирования, и при этом не будет означать превышения значения предельного содержания эндотоксинов (7). Максимально Допустимое Разведение (МДР) может быть рассчитано по формуле, приведенной в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (9).

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

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

Внимание: Для кинетических анализов значение λ соответствует наименьшей концентрации эндотоксина, используемой для построения калибровочной кривой.

Например, значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для циклофосфамида, установленное в Фармакопее, составляет 0,17 ЕЭ/мг, а концентрация активного вещества в растворе равна 20 мг/мл. Если в анализе используется калибровочная кривая с

наименьшей точкой, равной 0,05 ЕЭ/мл, МДР будет равен 1:68. В этом случае циклофосфамид может быть разведен в 1:68 раз (одна часть препарата в 68 частях его раствора в воде для ЛАЛ-теста).

Проверка на наличие мешающих факторов (ингибирование/усиление реакции) в кинетических методах проводится путем добавления эндотоксина в известной концентрации к испытуемому образцу или к его разведению, такая проверка проводится в двух повторностях. Для проведения проверки необходима калибровочная кривая, построенная с помощью стандарта эндотоксина RSE или КСЭ (в соответствии с Сертификатом Анализа КСЭ). Калибровочная кривая должна быть построена как минимум по трем разным концентрациям RSE или КСЭ. Дополнительная точка должна быть добавлена в каждом случае, когда стандартный диапазон концентраций калибровочной кривой увеличивается на один порядок (в десять раз). Калибровочная кривая должна соответствовать критериям, приведенным в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (9).

Для проверки ингибирования используется концентрация эндотоксина, близкая к середине диапазона концентраций, измеряемых по калибровочной кривой. Например, для калибровочной кривой с диапазоном измерения от 5 до 0,05 ЕЭ/мл концентрация эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца должна быть равна 0,5 ЕЭ/мл (См. РУТИННЫЕ АНАЛИЗЫ).

Можно считать, что испытуемый образец не ингибирует и не усиливает реакцию в том случае, если определенная в опыте концентрация эндотоксина находится в пределах $\pm 50\%$ от известной величины. Невозможность определить известную концентрацию эндотоксина с точностью $\pm 50\%$ свидетельствует о наличии мешающих факторов. Следует продолжать разведение образца водой для ЛАЛ-теста, не превышая значения МДР, до тех пор, пока определяемая концентрация эндотоксина не будет соответствовать приемлемым критериям (9).

β-ГЛЮКАНЫ.

ЛАЛ реактив Endosafe Endochrome-K может реагировать не только с эндотоксинами но и с β-глюканами. Перед проверкой образцов, содержащих β-глюканы следует заблокировать способность реактива реагировать с β-глюканами. Для этой цели может быть использован эндотоксин-специфичный (ES) буфер.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Микропланшеты

Стеклянные апиrogenные пробирки для разведений

Репетир со стерильными шприцами (Репетир Eppendorf® со шприцами на 0,5 и 5,0 мл Combitips® или аналогичное оборудование)

Стеклянные пипетки (рекомендуется) и калиброванные механические дозаторы со стерильными апиrogenными наконечниками

Вихревая мешалка

Ридер для микропланшет или ридер для пробирок.

Внимание: Материалы, используемые для определения содержания эндотоксинов должны быть валидированы или сертифицированы, они не должны содержать эндотоксинов в определяемых в тесте концентрациях.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКОГО ХРОМОГЕННОГО АНАЛИЗА

ЛАЛ-реактив Endochrome-K предназначен для проведения кинетического хромогенного анализа с помощью ридера для микропланшет или пробирок, который: 1) позволяет проводить измерение оптической плотности в течение всего периода инкубирования, и 2) совместим с компьютером и программным обеспечением, позволяющим анализировать данные путем линейной или полиномиальной регрессии. Примером комплексной измерительной системы, предназначенной для сбора, обработки и хранения данных по определению эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста, может быть ридер для микропланшет BioTek ELx808IU с программным обеспечением Endoscan-V (10). ЛАЛ-реактив Endosafe® Endochrome-K в соответствии с валидированной процедурой может быть использован и с автоматическими системами, предназначенными для проведения кинетического хромогенного анализа в пробирках.

Каждый опыт должен включать испытуемый препарат или его разведения, положительный контроль испытуемого образца или его разведения, положительный контроль или серию разведений контрольного стандарта, соответствующую диапазону концентраций, измеряемых с помощью калибровочной кривой, и отрицательный контроль. Анализ проводится как минимум в двукратной повторности. Следует придерживаться инструкций по использованию выбранной для проведения анализа автоматической системы измерений (8).

Метод: асептически переносят по 0,1 мл каждого образца в каждую лунку микропланшета или в пробирку в соответствии с картой планшета. Если используют ридеры для микропланшет, не оборудованные модулем инкубирования, возможно потребуется преинкубирование планшета для достижения однородности температуры. При установке рабочих параметров используемого оборудования следуют указаниям производителя ЛАЛ-реактива. В каждую лунку с помощью репетира быстро добавляют по 0,1 мл ЛАЛ-реактива (при комнатной температуре). ЛАЛ-реактив добавляют, начиная отрицательного контроля и заканчивая наиболее высокой концентрацией эндотоксина. Если ридер для микропланшет не перемешивает растворы автоматически, для перемешивания растворов постукивают по краю планшета несколько раз, после чего начинают отсчет времени измерения. По завершении желаемого периода измерения проводят программную обработку результатов анализа.

РУТИННЫЕ АНАЛИЗЫ

Рутинные анализы лучше всего проводить с использованием калибровочной кривой, у которой наибольшая концентрация в 100 раз больше наименьшей концентрации эндотоксина, каждый анализ должен включать стандартную кривую, состоящую как минимум из трех точек, проверенных в двукратной повторности. Например, 5, 0,5 и 0,05 ЕЭ/мл. Для внутривыпускаемого контроля и контроля сырья может потребоваться калибровочная кривая с более широким диапазоном измерений, при котором максимальная измеряемая концентрация в 10000 раз больше минимальной концентрации, например, от 50 ЕЭ/мл до 0,005 ЕЭ/мл. В случае, если используется калибровочная кривая с широким диапазоном измерения, в котором минимальная и максимальная концентрации отличаются более чем в 1000 раз, может быть использована полиномиальная модель регрессии.

Концентрация эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца должна быть эквивалентна или близка к средней концентрации, измеряемой калибровочной кривой. Например, эта концентрация должна быть меньше или равна 1,0 ЕЭ/мл или больше или равна 0,1 ЕЭ/мл для калибровочной кривой с диапазоном измерения от 10 ЕЭ/мл до 0,01 ЕЭ/мл. Для калибровочной кривой с диапазоном измерения 0,005-50 ЕЭ/мл концентрация эндотоксина в положительном контроле должна быть меньше или равна 5 ЕЭ/мл или больше или равна 0,05 ЕЭ/мл. Определенное среднее значение концентрации эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца должно составлять 50-200% от добавленной концентрации. В случае, когда необходимо подтверждение зарегистрированной в анализе контаминации испытуемого образца, в качестве контроля должна использоваться стандартная серия разведений эндотоксина. Можно рекомендовать способ подготовки положительного контроля, при котором эндотоксин добавляется непосредственно в соответствующую лунку микропланшета. С помощью этого способа можно подготовить положительный контроль испытуемого образца перед добавлением ЛАЛ-реактива Endosafe® Endochrome-K. Для этого к лунке, в которой содержится 100 мкл испытуемого образца, добавляют 10 мкл раствора RSE или КСЭ с концентрацией 5,0 ЕЭ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭНДОТОКСИНА

При проведении анализа ридер для микропланшет или пробирок контролирует изменение поглощения. Прибор измеряет время, необходимое для того, чтобы значение поглощения изменилось в значительной степени по сравнению с исходным обычно в диапазоне от 0,050 до 0,200 единиц оптической плотности (OD). Это время называется ПОРОГОВЫМ ВРЕМЕНЕМ (ONSET TIME). Программное обеспечение автоматически устанавливает корреляцию (log/log) Порогового Времени для каждой из проверяемых точек и соответствующей этому времени концентрации эндотоксина. Далее оцениваются параметры калибровочной кривой и достоверность результатов анализа. Ниже приведены примеры результатов, полученных для стандартной серии концентраций эндотоксина, и результаты определения концентрации эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца (концентрация 0,5 ЕЭ/мл).

ПРИМЕРЫ РЕЗУЛЬТАТОВ – ЛИНЕЙНАЯ РЕГРЕССИЯ

Образцы	КСЭ (ЕЭ/мл)	Среднее пороговое время реакции (сек)	Измеряемая концентрация (ЕЭ/мл)
Стандарт 1	50,0	337	
Стандарт 2	5,0	493	
Стандарт 3	0,5	801	
Стандарт 4	0,05	1400	
Стандарт 5	0,005	3025	
Исп. Образец 1	----	****	<0,005
Положительный контроль исп. образца	0,5	822	0,706 (141%)

Аппроксимирующее уравнение регрессии: $\text{Log}(y) = -0,236 * \text{Log}(x) + 2,879$

Коэффициент корреляции: R= -0,991

В этом примере в положительном контроле испытуемого образца получены результаты, свидетельствующие об отсутствии ингибирования. Отрицательный контроль должен давать результаты значительно ниже, чем результаты наименьшей из концентраций стандарта эндотоксина.

Если абсолютное значение коэффициента корреляции больше 0,980, для построения калибровочной кривой можно использовать модель полиномиальной регрессии. Полиномиальная регрессия вычисляется с использованием программного обеспечения Endoscan-V (10), или аналогичного. Дополнительная информация содержится в соответствующих руководствах по программному обеспечению и в главе, посвященной полиномиальной регрессии настоящей инструкции.

ПОЛИНОМИАЛЬНАЯ РЕГРЕССИЯ

Модель полиномиальной регрессии может быть использована для построения стандартной кривой при условии, что абсолютное значение коэффициента линейной корреляции больше или равно 0,980. Для аппроксимации лучшей полиномиальной функции к имеющимся данным могут быть использованы такие пакеты прикладных программ как Endoscan-V (10).

ВНИМАНИЕ: полиномиальная стандартная кривая не может использоваться для первоначальной квалификации опытов. Для проведения таких испытаний Руководство по валидации FDA допускает использование моделей линейной регрессии.

Порядок полиномиальной регрессии определяется следующим образом:

Endoscan-V n-1

Где n = количество используемых стандартных концентраций

Если результаты приведенного выше анализа обрабатывать с помощью полиномиальной модели (пять стандартных концентраций), получатся следующие результаты:

ПРИМЕРЫ РЕЗУЛЬТАТОВ – ПОЛИНОМИАЛЬНАЯ РЕГРЕССИЯ

Образцы	КСЭ (ЕЭ/мл)	Среднее пороговое время реакции (сек)	Измеряемая концентрация (ЕЭ/мл)
Стандарт 1	50,0	337	
Стандарт 2	5,0	493	
Стандарт 3	0,5	801	
Стандарт 4	0,05	1400	
Стандарт 5	0,005	3025	
Исп. Образец 1	---	****	<0,005
Положительный контроль исп. образца	0,5	822	0,445 (89%)

Аппроксимирующее уравнение регрессии:

$$\text{Log}(y) = 0,0031 * \text{Log}(x)^4 + 0,0001 * \text{Log}(x)^3 - 0,011 * \text{Log}(x)^2 - 0,216 * \text{Log}(x) + 2,837$$

Линейный коэффициент корреляции: R= -0,991

ОГРАНИЧЕНИЯ

В ЛАЛ-тесте могут быть испытаны образцы, которые не оказывают ингибирующего или усиливающего действия на реакцию, или если эти явления могут быть устранены разведением (см. правила расчета МДР) или специальной подготовкой образца, такой, например, как добавление буфера. Если ЛАЛ тест не может быть валидирован в концентрации, не превышающей максимально допустимого разведения, он не может быть заменой анализа «пирогенность», проводимого на кроликах.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Линейность: должна быть проверена линейность калибровочной кривой в пределах диапазона концентраций, используемых для определения содержания эндотоксина. Следует проверить не менее 3 разных концентраций, представляющих выбранный диапазон как минимум в трех повторностях (10). Абсолютное значение коэффициента корреляции r должно быть больше или равно значению 0,980 (9).

ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ДЛЯ КИНЕТИЧЕСКОГО ХРОМОГЕННОГО ТЕСТА

При проведении контрольных анализов готовой продукции с помощью кинетического хромогенного теста необходимо придерживаться требований, приведенных Фармакопее США 37 издания, включая требования к результатам для положительного контроля испытуемого образца,

которые должны составлять 50-200% от известной концентрации эндотоксина в контроле. Стандартные кривые должны иметь коэффициент корреляции $\leq -0,980$.

Компания Charles River Endosafe разработала специальное руководство по валидации оборудования, используемого для проведения кинетических анализов.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

ЛАЛ-реактив Endosafe® Endochrome-K стандартизован по Национальному стандарту эндотоксина США (RSE). Концентрация эндотоксина в испытуемом образце может быть измерена в том случае, если она находится в диапазоне измерений, заданных калибровочной кривой. Бактериальные эндотоксины могут содержаться в измеряемых количествах в воде или в материалах биологического происхождения в том случае, если способы их очистки были недостаточно эффективны. Содержание эндотоксина, определенное в анализе, следует сравнить с установленным для испытуемого препарата значением предельного содержания бактериальных эндотоксинов.

С помощью ЛАЛ-реактива Endosafe Endochrome-K при определенных условиях можно определять концентрацию эндотоксинов в ряду от 100 ЕЭ/мл до 0,001 ЕЭ/мл. К факторам, определяющим возможный диапазон измерений относятся: 1) свойства оборудования, используемого для измерений, 2) выбор модели регрессии, и 3) качество вспомогательного оборудования и реактивов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bang, F. B. "A Bacterial Disease of Limulus Polyphemus." Bull. Johns. Hopkins. Hosp., 98, p. 325 (1956).
2. Cooper, J.F. and Harbert J.C. "Endotoxin as a Cause of Aseptic Meningitis after Radionuclide Cisternography." J. Nucl. Med., 16, p. 809 (1976).
3. Cooper, J.F., Levin.J. and Wagner, H.N. "Quantitative Comparision of In Vitro and In Vivo Methods for the Detection of Endotoxin." J. Lab. Clin. Med., 78. p. 138 (1971).
4. Hochstein, H.D. "The LAL Test versus the Rabbit Pyrogen Test for Endotoxin Detection: Update '87." Pharm. Technol., 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., 19, p. 186 (1968).
6. McCullough, K.Z. "Process Control: In-process and Raw Material Testing Using LAL." Pharm. Technol., 12(5) p. 40 (1988).
7. Weary, M.E. "Understanding and setting endotoxin limits" J.Parent. Sci. & Tech., 44:1., p. 16 (1990).
8. Cooper, J.F. "Resolving LAL Test Interferences." J.Parent. Sci. & Tech., 44:1, p.13 (1990).
9. Bacterial endotoxin test <85>. In The U.S. Pharmacopeia, 37rd rev., United Book Press, Inc., Baltimore, MD.
10. Reference Guide for Endoscan-V, Charles River Laboratories, INC., 1023 Wappoo Road, Suite 43B, Charleston, SC, 29407 USA.

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