

Лиофилизированный лизат амебоцитов для проведения гель-тромб теста (один тест во флаконе)

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ

G020015, G020030, G020060, G020125, G020250, G020500

НАЗНАЧЕНИЕ

Лиофилизированный лизат амебоцитов для проведения гель-тромб теста (ЛАЛ) предназначен для использования в условиях *in vitro* с целью определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий (липополисахаридов) методом гель-тромб теста.

Описанные в документе процедуры испытания соответствуют главе 85 «Испытания на бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Продукт предназначен для использования только в условиях *in vitro*. Не допускается использование для выявления эндотоксемии у людей.

ВЫПОЛНЕНИЕ АНАЛИЗА

Гель-тромб тест (ЛАЛ-тест) — это качественный анализ, который выполняют для определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Анализ проводят путем смешивания лиофилизированного лизата амебоцитов с испытуемым образцом, после чего смесь инкубируют в течение 60 минут при температуре 37 °С. Положительная реакция характеризуется образованием геля, который не разрушается после переворачивания пробирки на 180° — это указывает на то, что концентрация эндотоксина в испытуемом образце соответствует заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива, или превышает ее. Отрицательная реакция характеризуется отсутствием такого геля. Это свидетельствует о том, что концентрация эндотоксина в испытуемом образце ниже заявленной чувствительности.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Лиофилизированный лизат амебоцитов для проведения гель-тромб теста представляет собой водный экстракт амебоцитов китайского мечехвоста (*Tachypleus tridentatus*). Лизат содержит группу ферментов сериновых протеаз (проферментов), активация которых может происходить под действием бактериальных эндотоксинов. Эндотоксины активируют проферменты, что приводит к активации фермента (коагулаза), который затем активирует коагулоген, образующий коагулин. Коагулин в свою очередь формирует гелеобразный тромб. При достаточно высокой концентрации эндотоксина образуется плотный гель, который не разрушается при переворачивании пробирки с испытуемым образцом. В этом случае результат реакции считается положительным. Положительный результат указывает, что концентрация эндотоксина в испытуемом образце соответствует заявленной чувствительности реактива, или превышает ее. Если такой гель не образуется, то результат реакции считается отрицательным. Это свидетельствует о том, что концентрация

эндотоксина в испытуемом образце ниже заявленной чувствительности.

РЕАКТИВЫ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКТА

ЛАЛ-реактив для гель-тромб теста:

ЛАЛ-реактив для гель-тромб теста производится из лизата амебоцитов *Tachypleus tridentatus*. Лизат стабилизирован с использованием одновалентных и двухвалентных катионов. Чувствительность (λ) — это минимальная концентрация стандартного образца эндотоксина, при которой возможно образование гель-тромба в стандартных условиях. Чувствительность серии в ЕЭ/мл указана на этикетке упаковки.

Условия хранения:

Хранить при температуре 2–8 °С. Избегать воздействия температуры выше 25 °С или яркого света в течение длительного времени.

Разведение:

При использовании флаконов для одного анализа серии G02 разводят ЛАЛ-реактив для гель-тромб теста путем добавления 0,2 мл испытуемого образца или контрольных растворов. Разведенный лизат следует использовать в течение 10 минут.

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В КОМПЛЕКТ:

1. Вода для испытания на бактериальные эндотоксины: концентрация эндотоксина < 0,005 ЕЭ/мл.
2. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ): контрольный стандарт эндотоксина используется для подтверждения чувствительности ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста, валидации продукта и приготовления контрольных растворов для оценки ингибирования. Активность КСЭ указана в сертификате анализа.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В КОМПЛЕКТ:

1. Пипетки апиrogenные 0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл. Или автоматические дозаторы с апиrogenными наконечниками.
2. Стеклонные пробирки для разведения, без эндотоксинов, для приготовления стандартных растворов эндотоксина.
3. Стеклонные пробирки для реакций, без эндотоксинов, 10 x 75 мм (только для флаконов на несколько определений).
4. Вихревая мешалка.
5. Термостат или водяная баня без циркуляции (37 ± 1 °С).
6. Таймер.
7. Штатив для пробирок.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА И РЕАКТИВА

Вся стеклонная посуда, пластиковая посуда и растворители, которые будут контактировать с испытуемым образцом или испытуемыми реактивами, не должны содержать эндотоксины. Стеклонная посуда и другие термостойкие инструменты подлежат депиrogenизации в сухожаровом шкафу согласно валидированной процедуре, в течение общепринятого минимального времени 60 минут при температуре 250 °С.

Необходимо всегда соблюдать принципы асептики.

Испытуемые образцы следует хранить в условиях, при которых прекращается бактериальная активность. Временное хранение образцов (в течение менее 24 часов) возможно при температуре 2–8 °С, более длительное хранение — при температуре ниже –10 °С.

Оптимальный диапазон pH для ЛАЛ-теста определения эндотоксинов составляет от 6,0 до 8,0. Кислотный и щелочной образец можно скорректировать до желаемого диапазона pH путем добавления не содержащего эндотоксин 0,1 н. натрия гидроксида, 0,1 н. хлористоводородной кислоты или не содержащего эндотоксин Трис-буфера.

Следует выполнить проверку наличия возможных мешающих факторов и устранить их согласно описанию, представленному в разделе **«Мешающие факторы в испытуемом образце, ингибирующие реакцию»**.

Приготовление контрольных растворов

1. Стандартные растворы эндотоксина

Разводят контрольный стандарт эндотоксина водой для испытания на бактериальные эндотоксины, готовят стандартные рабочие растворы эндотоксина с концентрацией 2λ, λ, 0,5λ, и 0,25λ. Готовят раствор эндотоксина непосредственно перед использованием, чтобы избежать снижения активности в результате поглощения.

2. Положительный контроль

Положительный контроль в определенных условиях можно использовать вместо ряда стандартов эндотоксина. Положительный контроль представляет собой раствор эндотоксина с концентрацией 2λ.

3. Положительные контроли испытуемого образца:

Положительные контроли испытуемого образца — это испытуемые растворы со стандартной добавкой эндотоксина. Как правило, концентрация раствора со стандартной добавкой составляет 2λ. См. раздел **«Мешающие факторы в испытуемом образце, ингибирующие реакцию»**.

4. Отрицательный контроль:

В качестве отрицательного контроля используют воду для испытания на бактериальные эндотоксины.

Приготовление ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста

Предостережение: Разведение ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста следует выполнять непосредственно перед использованием.

При использовании флаконов для одного анализа серии G02 разводят ЛАЛ-реактив для гель-тромб теста путем добавления 0,2 мл испытуемого образца или контрольных растворов.

Осторожно и тщательно перемешивают круговыми движениями. Не следует встряхивать и перемешивать на вихревой мешалке, чтобы не допустить образования пены.

ПРОЦЕДУРА ИСПЫТАНИЯ

При использовании флаконов для одного анализа серии G02 добавляют 0,2 мл воды для испытания на бактериальные эндотоксины в качестве отрицательного контроля,

стандартного раствора эндотоксина или испытуемого образца; Осторожно и тщательно перемешивают. Недостаточно тщательное смешивание является частой причиной получения неудовлетворительных результатов анализа. Инкубируют смесь при температуре 37 °С в течение 60 минут. Следует избегать вибрации во время инкубации.

При одновременном проведении испытания большого количества образцов анализа следует разделить на серии и начинать их выполнение с интервалами времени, которые позволят задокументировать итоговые показатели каждой из них в заданный промежуток времени.

Регистрация результатов

Поочередно извлекают все пробирки и регистрируют результаты для каждой из них. Переворачивают пробирку плавным движением. Положительный результат реакции характеризуется образованием геля, который не разрушается при переворачивании пробирки. Отрицательный результат реакции характеризуется отсутствием плотного сгустка после переворачивания. Усиление мутности или вязкости учитывают как отрицательный результат реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Результаты для всех повторностей отрицательного контроля должны быть отрицательными. Положительные результаты указывают на загрязнение ЛАЛ-реактива, воды для испытания на бактериальные эндотоксины или стеклянной посуды.

Результаты для всех повторностей положительного контроля должны быть положительными. Отрицательные результаты указывают на возможное снижение активности ЛАЛ-реактива, снижение активности КСЭ или неправильное разведение эндотоксина.

Результаты для положительных контролей испытуемого образца должны быть положительными. Если результат для положительного контроля испытуемого образца отрицательный, при этом результат для положительного контроля положительный, это может свидетельствовать о наличии мешающих факторов в испытуемом образце. См. раздел «Мешающие факторы в испытуемом образце, ингибирующие реакцию».

Определение максимально допустимого разведения (МДР)

Максимально допустимое разведение (МДР) — это наибольшее допустимое разведение испытуемого вещества, при котором возможно определение предельного уровня содержания эндотоксинов.

Значение МДР рассчитывают по следующим формулам:

$$MVD = \frac{L \times C}{\lambda}$$

L — предельный уровень содержания эндотоксинов в испытуемом веществе. L указывают в единицах, например, ЕЭ/мл, ЕЭ/мг, ЕЭ/ед.

L = K/M, где

K — максимально допустимая доза эндотоксина на килограмм массы тела в час,

М — максимально допустимая доза вещества на килограмм массы тела в час.

С — концентрация испытуемого вещества. С указывают в мг/мл, если предельный уровень эндотоксина указан по массе (ЕЭ/мг), и в ед/мл, если предельный уровень эндотоксина указан по единицам биологической активности (ЕЭ/ед).

λ = заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста.

Подтверждение чувствительности ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста (λ)

Гель-тромб тест проводят в 4 повторностях с использованием испытуемого ЛАЛ-реактива и стандартных растворов эндотоксина с концентрацией 2λ , λ , $0,5\lambda$ и $0,25\lambda$.

Анализ действителен только в случае, если результаты для всех повторностей растворов с концентрацией 2λ положительны, результаты для всех повторностей растворов с концентрацией $0,25\lambda$ и отрицательных контролей отрицательные. Заявленная чувствительность подтверждается, если наблюдаемая чувствительность составляет от $0,5\lambda$ до 2λ .

Наблюдаемая чувствительность равна среднему геометрическому (G) конечной точки (e).

$$G = (e_1 \times e_2 \times \dots \times e_f)^{1/f} = \lg^{-1}(\sum(\lg e)/f)$$

Конечной точкой реакции (e) является положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрацией КСЭ. f — число повторностей (анализируемых пробирок).

Пример подтверждающего анализа для образца с заявленной чувствительностью (λ) ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста 0,25 ЕЭ/мл.

Повторности f	Концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)				Отрицательный контроль	Конечная точка реакции (e) (ЕЭ/мл)	$\lg_{10} e$	Среднее значение e $\lg_{10} e$	G (ЕЭ/мл)
	2λ	λ	$0,5\lambda$	$0,25\lambda$					
	0,5	0,25	0,125	0,0625					
1	+	+	-	-	-	0,25	-0,002	-0,077	0,21
2	+	+	+	-	-	0,125	-0,903		
3	+	+	-	-		0,25	-0,002		
4	+	+	-	-		0,25	-0,002		

Наблюдаемая чувствительность 0,21 ЕЭ/мл находится в пределах от 0,125 до 0,5 ЕЭ/мл, следовательно, заявленная чувствительность 0,25 ЕЭ/мл подтверждена.

Полуколичественный гель-тромб тест

Количественное определение концентрации эндотоксина путем определения конечной точки в серии разведений испытуемого образца. В следующем примере образец разводят водой для испытания на бактериальные эндотоксины, чувствительность ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста составляет 0,25 ЕЭ/мл.

Повторности	Разведение образца						Отрицательный	Разведение в конечной	Конечная точка	Среднее	$\lg_{10}^{-1}$
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64					
1	+	+	+	-	-	-	-	1:8 (0,125)	-0,903	-1,054	0,088 (1:11,3)
2	+	+	+	+	-	-	-	1:16 (0,0625)	-1,204		

Концентрация эндотоксина = чувствительность ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста $\times$ разведение в конечной точке

$$= 0,25 \text{ ЕЭ/мл} \times 1,3$$

= 2,83 ЕЭ/мл

Гель-тромб тест, предельное содержание

Этот анализ проводят, если в фармакопейной статье указано предельное содержание бактериальных эндотоксинов.

Выполняют анализ разведенного образца, положительных контролей испытуемого образца, положительных контролей и отрицательных контролей; коэффициент разведения соответствует МДР. Если анализ действителен (см. раздел «**Результаты и интерпретация**»), документируют результаты.

Отрицательные результаты для всех повторностей испытуемых образцов указывают на то, что концентрация эндотоксинов в этом образце не достигает предельного содержания бактериальных эндотоксинов. Это означает, что образец успешно прошел гель-тромб тест на предельное содержание бактериальных эндотоксинов. Положительные результаты для всех повторностей испытуемых образцов указывают на то, что концентрация эндотоксинов в этом образце превышает предельное содержание бактериальных эндотоксинов. Это означает, что образец не прошел гель-тромб тест на предельное содержание бактериальных эндотоксинов. Если для одной повторности получен положительный результат, а для другой — отрицательный результат, то следует повторить анализ в четырех повторностях. Испытание будет пройдено лишь в том случае, если для всех четырех повторностей будет получен отрицательный результат повторного анализа.

МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ В ИСПЫТУЕМОМ ОБРАЗЦЕ, ИНГИБИРУЮЩИЕ РЕАКЦИЮ

Тест на определение наличия в испытуемом образце мешающих факторов, способных ингибировать реакцию, часто используют для выявления подобных факторов. Готовят серию двукратных разведений эндотоксина в воде для испытания на бактериальные эндотоксины и матрице испытуемого образца, выполняют параллельный анализ двух серий, затем рассчитывают среднее геометрическое конечной точки реакции для каждой серии. Если среднее геометрическое конечной точки реакции определения эндотоксина в матрице испытуемого образца находится в пределах от 0,5λ до 2λ, то в образце отсутствуют мешающие факторы, способные ингибировать реакцию. В обратном случае предполагается наличие мешающих факторов в испытуемом образце.

Ингибирование реакции из-за наличия мешающих факторов в образце, как правило, зависит от концентрации и может быть снижено путем разведения водой для испытания на бактериальные эндотоксины. Разведение не должно превышать МДР. Применение более чувствительного ЛАЛ-реактива позволяет увеличить разведение образца, что может способствовать лучшему устранению мешающих факторов.

ССЫЛКИ НА ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Руководство по валидации ЛАЛ-теста как испытания на определение бактериальных эндотоксинов в готовом продукте для анализа лекарственных препаратов для парентерального введения, биологических лекарственных препаратов и медицинских изделий для медицинского и ветеринарного применения. Департамент здравоохранения и социального обеспечения США, Служба общественного здравоохранения, Управление контроля качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, декабрь 1987 г.

2. Глава 85. Бактериальные эндотоксины. Роквилл, штат Мэриленд: Фармакопоя США.
3. Bang, F. B. 1956. A Bacterial Disease of Limulus Polyphemus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98:325-351.
4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
6. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.