

ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЙ ЛИЗАТ АМЕБОЦИТОВ ДЛЯ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТА флакон на несколько определений

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ

G520030, G520060, G520125, G520250, G520500

НАЗНАЧЕНИЕ

Лиофилизированный лизат амёбоцитов (АЛ, ТАЛ или ЛАЛ) для проведения гель-тромб теста предназначен для использования в условиях *in vitro* для определения грамотрицательных бактериальных эндотоксинов (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 АЛ-тест — это качественный анализ, который выполняют для определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Анализ проводят путем смешивания лизата амёбоцитов 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 АЛ-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 амёбоцитов представляет собой водный экстракт амёбоцитов 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

Лиофилизированный лизат амебоцитов:

Лиофилизированный лизат амебоцитов 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 на несколько определений серии G52XXXX разводят лиофилизированный лизат амебоцитов путем добавления во флакон 5,2 мл воды для испытания на бактериальные эндотоксины.

Разведенный лизат следует использовать в течение 10 минут. При немедленной заморозке при температуре ниже –20 °С лизат сохраняет стабильность в течение до 28 дней. Разведенный лизат допускается замораживать и размораживать только один раз.

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ, КОТОРЫЕ НЕ ВХОДЯТ В КОМПЛЕКТ:

1. Вода для испытания на бактериальные эндотоксины: концентрация эндотоксина < 0,003 ЕЭ/мл.
2. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ): контрольный стандарт эндотоксина используют для подтверждения чувствительности лиофилизированного лизата амебоцитов, 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 без эндотоксинов объемом 0,2, 1,0, 5,0 мл. Или автоматические дозаторы с наконечниками без эндотоксинов.
2. Стеклянные пробирки для разведения, без эндотоксинов, для приготовления стандартных растворов эндотоксина.
3. Стеклянные 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 стеклянная посуда, пластиковая посуда и растворители, которые будут контактировать с испытуемым образцом или испытуемыми реактивами, не должны содержать эндотоксины. Стеклянная посуда и другие термостойкие инструменты подлежат депирогенизации 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 рН для ТАЛ-теста определения эндотоксинов составляет от 6,0 до 8,0. Кислотный и щелочной образец можно скорректировать до желаемого диапазона рН 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 лиофилизированного лизата амебоцитов

Предостережение: выполнять разведение лиофилизированного лизата амебоцитов следует непосредственно перед использованием.

При использовании флаконов на несколько определений серии G52XXXX разводят лиофилизированный лизат амебоцитов путем добавления во флакон 5,2 мл воды для испытания на бактериальные эндотоксины.

Осторожно и тщательно перемешивают круговыми движениями. Не следует встряхивать и

перемешивать на вихревой мешалке, чтобы не допустить образования пены.

ПРОЦЕДУРА ИСПЫТАНИЯ

При использовании флаконов на несколько определений серии G52XXXX добавляют 0,1 мл воды для испытания на бактериальные эндотоксины, стандартные растворы эндотоксина или испытуемый образец в каждую из пробирок для реакции, затем добавляют 0,1 мл лиофилизированного лизата амебоцитов;

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 позволяют 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 лиофилизированного лизата амебоцитов, воды для испытания на бактериальные эндотоксины или стеклянной посуды.

Результаты для всех повторностей положительного контроля должны быть положительными. Отрицательные результаты указывают на возможное снижения активности лиофилизированного лизата амебоцитов, 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 — максимальная допустимая доза эндотоксина на килограмм массы тела в час. M — максимальная допустимая доза вещества на килограмм массы тела в час.

C — концентрация испытуемого вещества. C 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 лиофилизированного лизата амебоцитов.

Подтверждение заявленной чувствительности лиофилизированного лизата амебоцитов (λ)

Гель-тромб тест проводят в 4 повторностях с использованием испытуемого лиофилизированного лизата амебоцитов 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) лиофилизированного лизата амебоцитов $0,25$ ЕЭ/мл.

Повторности /	Концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)				Отрицательный контроль	Конечная точка реакции (ЕЭ/мл) e	$\log_{10} e$	Среднее значени e $\log_{10} e$	G (ЕЭ/мл)
	2λ	λ	$0,5\lambda$	$0,25\lambda$					
	0,5	0,25	0,125	0,0625					
1	+	+	-	-	-	0,25	-0,602	-0,677	0,21
2	+	+	+	-	-	0,125	-0,903		
3	+	+	-	-		0,25	-0,602		
4	+	+	-	-		0,25	-0,602		

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 лиофилизированного лизата амебоцитов составляет $0,25$ ЕЭ/мл.

Повторность и f	Разведение образца						Отрицательный контроль	Разведение в конечной точке	Конечная точка Log10	Среднее значение	Log 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
2	+	+	+	+	-	-	-	1:16 (0,0625)	-1,204		(1:11,3)

Концентрация эндотоксина = чувствительность лиофилизированного лизата амебоцитов × разведение в конечной точке

$$= 0,25 \text{ ЕЭ/мл} \times 11,3$$

$$= 2,83 \text{ ЕЭ/мл}$$

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 лиофилизированного лизата амебоцитов 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: Фармакопея 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.