ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТ TACHYPLEUS AMEBOCYTE LYSATE (TAL)

КАТАЛОЖНЫЙ НОМЕР

G520030, G520060, G520125, G520250, G520500

НАЗНАЧЕНИЕ

ТАЛ-реактив для гель-тромб теста (TAL) предназначен для определения *In Vitro* бактериальных эндотоксинов грам-отрицательных бактерий (липополисахаридов) методом гель-тромб тест.
Описанная ниже процедура анализа соответствует требованиям статьи <85> Бактериальные эндотоксины Фармакопеи США.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Только для использования *In Vitro*. Не использовать для диагностики эндотоксемии у человека.

ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Гель-тромб тест – это качественный анализ для определения бактериальных эндотоксинов грам-отрицательных бактерий. Анализ проводят путем смешивания ТАЛ-реактива с испытуемым образцом и последующего инкубирования реакционной смеси в течение 60 минут при температуре 37°C. Если в результате реакции образовался гель, который не стекает при переворачивании пробирки на 180°, результат считается положительным, что означает, что содержание эндотоксинов равно или более значения чувствительности ТАЛ-реактива, указанного на этикетке. Если гель не образовался, результат считается отрицательным, что означает, что содержание эндотоксинов менее значения чувствительности ТАЛ-реактива, указанного на этикетке.

ПРИНЦИПЫ

Лизат амебоцитов Tachypleus (TAL) – это водный экстракт циркулирующих амебоцитов китайского мечехвоста (*Tachypleus tridentatus)*. Лизат содержит каскад ферментов (сериновых протеаз), который может быть активирован бактериальными эндотоксинами. Эндотоксины активируют проферменты, в результате чего образуются активированные ферменты (коагулазы), последние активируют коагулоген, который превращается в коагулин, коагулин самоассоциируется в студенистый гель.
Когда концентрация эндотоксинов достаточно высока, образовавшийся гель плотный и остается неподвижным при переворачивании пробирки, результат оценивается как положительный. Положительный результат означает, что концентрация эндотоксинов в образце более или равна указанной на этикетке чувствительности. Если неподвижный гель не образовался, результат оценивается как отрицательный, что означает, что содержание эндотоксинов менее значения чувствительности, указанной на этикетке.

РЕАКТИВЫ, ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

ТАЛ-реактив

Лиофилизированный ТАЛ-реактив, полученный из лизата амебоцитов *Tachypleus tridentatus*. Лизат стабилизирован моно- и дивалентными катионами. Чувствительность реактива (λ) – это минимальная концентрация Международного стандарта эндотоксина, которая приводит к образованию плотного геля в стандартных условиях.
Чувствительность реактива, ЕЭ/мл, указана на этикетке флакона.

Условия хранения:

Хранить при температуре 2~8° С. Избегать хранения при температуре выше 25°С или воздействия прямых солнечных лучей в течение продолжительного времени.

Растворение:

Для флаконов с каталожными номерами G52XXXX растворите ТАЛ-реактив путем добавления во флакон 5,2 мл воды БЭТ (воды для ЛАЛ-теста).
Разведенный лизат должен быть использован в течение 10 минут. Если лизат заморозить при температуре -20°С сразу после разведения, он сохраняет стабильность в течение 28 дней. Размораживать реактив можно только один раз.

РЕАКТИВЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. Вода БЭТ (вода для ЛАЛ-теста): концентрация эндотоксинов < 0.003 ЕЭ/мл.
2. Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ): контрольный стандарт используется для подтверждения чувствительности ТАЛ-реактива, валидации препарата и подготовки контролей ингибирования. Активность КСЭ указывается в сертификате анализа.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В ПОСТАВКУ

1. Апирогеные пипетки на 0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл или автоматические дозаторы с апирогенными наконечниками.
2. Стеклянные апирогенные пробирки для разведений для подготовки разведений стандартов эндотоксина.
3. Стеклянные апирогенные пробирки для реакции 10 × 75 мм (только для флаконов на несколько определений).
4. Вортекс.
5. Термоблок или водяная баня без циркуляции воды (37 ± 1°С).
6. Таймер.
7. Штатив для пробирок.

ПОДГОТОВКА ИСПЫТУЕМОГО ОБРАЗЦА И РЕАКТИВОВ

Вся используемая стеклянная и пластиковая посуда и растворители, контактирующие с испытуемыми образцами или реактивами, должны быть свободными от эндотоксинов. Стеклянная посуда, другие термоустойчивые материалы и оборудование могут быть депирогенизированы в сухожаровом шкафу с использованием валидированного режима, обычно минимальное время и температура составляют 60 минут и 250°С.
Следует использовать технику асептической работы на всем протяжении анализа.
Испытуемые образцы должны храниться в условиях, при которых остановлена вся бактериологическая активность. Образцы следует хранить при температуре 2-8°С не более

24 часов или при температуре ниже -10°C в течение более длительного времени. Оптимальный диапазон pH для реакционной смеси составляет от 6.0 до 8.0. Кислые или щелочные образцы могут быть доведены до желаемого значения pH с помощью апирогенных 0.1N растворов натрия гидроксида или хлороводородной кислоты или апирогенного трис-буфера.

Препарат следует проверить на возможность ингибирования, в случае необходимости ингибирование должно быть преодолено как описано в разделе ИНГИБИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА.

Подготовка контролей

1. Стандарты эндотоксина
   Растворите контрольный стандарт эндотоксина с помощью воды для ЛАЛ-теста (вода БЭТ), подготовьте рабочие растворы эндотоксина с концентрацией 2λ, λ, 0.5λ и 0.25λ. Готовить растворы эндотоксина следует непосредственно перед использованием во избежание потери активности ввиду адсорбции.
2. Положительный контроль
   В определенных условиях можно использовать положительный контроль вместо серии разведений стандартов эндотоксина. Положительный контроль представляет собой раствор эндотоксина с концентрацией 2λ.
3. Положительный контроль препарата:
   Положительный контроль препарата представляет собой испытуемый образец, к которому добавлен эндотоксин в концентрации 2λ. Обратитесь к разделу ИНГИБИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА.
4. Отрицательный контроль:
   В качестве отрицательного контроля используется вода для ЛАЛ-теста (вода БЭТ).

Подготовка лизата амебоцитов Tachypleus

Предупреждение: растворяйте ТАЛ-реактив непосредственно перед использованием.
Для флаконов с каталожными номерами G52XXXX растворите ТАЛ-реактив путем добавления во флакон 5,2 мл воды БЭТ (воды для ЛАЛ-теста).
Перемешайте осторожно, но тщательно. Не перемешивайте на вортексе, так как раствор вспенится.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

При использовании флакона на несколько определений с каталожными номерами G52XXXX внесите по 0,1 мл воды для ЛАЛ-теста, стандартов эндотоксина или испытуемого образца в каждую реакционную пробирку, затем добавьте в каждую пробирку по 0,1 мл ТАЛ-реактива. Перемешайте осторожно, но тщательно. Недостаточное перемешивание часто является причиной получения неудовлетворительных результатов. Инкубируйте реакционную смесь при 37°C в течение 60 минут. Избегайте вибрации во время инкубирования. Если одновременно анализируется большое число образцов, тест должен начинаться с такими интервалами, которые позволят снимать результаты по каждой пробирке в пределах установленного времени.

Оценка результатов

Извлекайте пробирки по одной. Переворачивайте пробирку одним плавным движением. Положительным результатом считается образование геля, который не стекает при переворачивании пробирки. Отрицательный результат характеризуется отсутствием плотного геля после переворачивания. Увеличение мутности или вязкости раствора считается отрицательным результатом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Для всех повторностей с отрицательным контролем должны быть получены отрицательные результаты, положительные результаты свидетельствуют о контаминации ТАЛ-реактива, воды для ЛАЛ-теста (воды БЭТ) или стеклянной посуды.

Для всех повторностей с положительным контролем должны быть получены положительные результаты, отрицательные результаты могут говорить о том, что снизилась активность ТАЛ-реактива, контрольного стандарта эндотоксина или допущена ошибка в приготовлении разведений эндотоксина.

Для положительного контроля препарата результаты должны быть положительными. Если для положительного контроля препарата получены отрицательные результаты, в то время как в положительном контроле получены положительные результаты, можно предположить наличие ингибирования. В этом случае обратитесь к разделу ИНГИБИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА.

Определение Максимально допустимого разведения

Максимально допустимое разведение (МДР) – это максимально возможное разведение испытуемого препарата, в котором может быть определено предельное содержание эндотоксинов.

Рассчитайте значение МДР, используя следующую формулу:

$$\text{МДР} = \frac{L \times C}{\lambda}$$

L предельное содержание бактериальных эндотоксинов в испытуемом образце, L может быть выражено в ЕЭ/мл, ЕЭ/мг, ЕЭ/изделие.

L = K/M, где

K - пороговая пирогенная доза, вводимая на один килограмм веса в течение одного часа, M - максимальная терапевтическая доза препарата, вводимая на один килограмм веса в течение одного часа.

C - концентрация активного вещества в испытуемом препарате. C может быть выражено в мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в ЕЭ/мг, и в ЕД/мл, если содержание эндотоксинов выражено на единицу биологической активности (ЕЭ/ЕД).

λ - чувствительность ТАЛ-реактива, указанная на этикетке.

Подтверждение заявленной чувствительности ТАЛ-реактива (λ)

В анализе испытывается ТАЛ-реактив в четырех повторностях с растворами стандартов эндотоксина в концентрациях 2λ, λ, 0.5λ и 0.25λ.

Результаты анализа считаются удовлетворительными только в том случае, когда для всех повторностей с концентрацией 2λ получены положительные результаты, а для всех повторностей с концентрацией 0.25λ и для отрицательного контроля получены отрицательные результаты. Заявленная чувствительность подтверждена, если полученное в опыте значение чувствительности находится в пределах 0.5λ и 2λ.

Полученное в опыте значение чувствительности равно среднему геометрическому (***G***) десятичных логарифмов конечной точки реакции для каждой повторности (e).

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

Конечная точка реакции (e) – это наименьшая концентрация эндотоксина, которая дала положительный результат в данной повторности, f – количество повторностей в анализе.

Пример анализ подтверждения заявленной чувствительности для ТАЛ-реактива с чувствительностью (λ) 0.25 ЕЭ/мл.

Повторности f	Концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл)				Отрицательный контроль	Конечная точка реакции (ЕЭ/мл) e	Log_{10} e	Среднее значение Log_{10} e	G (ЕЭ/мл)
	2λ	λ	0,5λ	0,25λ					
	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		

Полученное в опыте значение чувствительности 0.21 ЕЭ/мл находится между значениями 0.125 и 0.5 ЕЭ/мл, таким образом, заявленная чувствительность 0.25 ЕЭ/мл подтверждена.

Количественный гель-тромб тест

Количество эндотоксинов в образце определяют путем нахождения конечной точки реакции в серии разведений испытуемого образца. В данном примере образец разводят водой для ЛАЛ-теста (водой БЭТ), чувствительность ТАЛ-реактива 0.25 ЕЭ/мл.

Повторности	Разведение образца						Отрицательный контроль	Разведение в конечной точке	Конечная точка Log10	Среднее значение	$Log10^{-1}$
f	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 эндотоксинов = чувствительность ТАЛ-реактива × фактор разведения конечной точки реакции.

= 0.25 EU/ml×11.3
= 2.83EU/ml

Качественный гель-тромб тест

Тест используется в том случае, когда в нормативной документации указано предельное содержание бактериальных эндотоксинов.

Испытуемый образец проверяют в МДР вместе с положительным контролем препарата, положительным контролем и отрицательным контролем. Если в анализе получены достоверные результаты (см. раздел **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ**), проводят оценку результатов для пробирок с препаратом. Если для пробирок с препаратом получены отрицательные результаты, это указывает на то, что концентрация эндотоксинов в образце менее предельного содержания эндотоксинов, что означает, что препарат прошел испытание в гель-тромб тесте. Если для пробирок с препаратом в обеих повторностях получены положительные результаты, это указывает на то, что концентрация эндотоксинов в образце превышает значение предельного содержания эндотоксинов, что означает, что препарат не прошел испытание в гель-тромб тесте. Если для одной повторности получен положительный результат, в то время как для другой получен отрицательный результат, следует повторить анализ в четырех повторностях, препарат считается выдержавшим испытание, если для всех четырех повторностей получены отрицательные результаты.

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТА

Тест на ингибирование препарата часто используется для оценки наличия мешающих факторов в образце. Подготовьте серию двукратных разведений стандарта эндотоксина на воде для ЛАЛ-теста (воде БЭТ) и на растворе испытуемого препарата, проведите анализ параллельно для двух серий разведений и рассчитайте среднее геометрическое значение концентрации эндотоксинов для конечной точки реакции для каждой серии.

Если среднее геометрическое значение для серии разведений эндотоксина на растворе препарата находится в диапазоне от 0.5λ до 2λ, считается, что образец не содержит мешающих факторов. В противном случае подразумевается наличие мешающих факторов в препарате.

Ингибирование препарата обычно зависит от его концентрации и может быть уменьшено с помощью разведений препарата на воде для ЛАЛ-теста (воде БЭТ). Разведение препарата не должно превышать МДР. Использование ТАЛ-реактива с более высокой чувствительностью позволяет достичь больших разведений образца, что может способствовать преодолению ингибирования.

ССЫЛКИ

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte 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.
2. Chapter <85> Bacterial Endotoxins. Rockville, MD: United States Pharmacopeia.
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.