ISIRI

14153

1st .Edition

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

استاندارد ملی ایران

۱۴۱۵۳

چاپ اول

فناوری نانو - آزمون اندوتوکسین نانومواد در سیستم‌های برون‌تن - روش آزمون Limulus Amebocyte lysate(LAL)

Nanotechnologies - Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems-lumulus amebocyte lysate (LAL) test

ICS:07.100.99;07.030:11.100.10

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست-محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

"فناوری نانو - آزمون اندوتوکسین نانومواد در سیستم‌های برون‌تن- روش آزمون "Limulus Amebocyte Lysate(LAL)

	سمت و/ یا نمایندگی
رئیس:	
قاضی خوانساری، محمود (دکترای سم شناسی)	عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پرشکی تهران وعضو کمیته فنی متناظر فناوری نانو
دبیر:	
اربابی، سپیده (دکترای سم شناسی)	عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد- واحد علوم دارویی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
احمدی، راضیه (دکتری داروسازی)	کارشناس سازمان غذا و دارو وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی
پوی پوی، حسن (کارشناس ارشد شیمی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو و دبیر کمیته فنی متناظر فناوری نانو
سیفی، مهوش (کارشناس ارشد مدیریت دولتی)	کارشناس استاندارد و نایب رئیس کمیته فنی متناظر فناوری نانو
کوهی، محمد کاظم (دکتری سم شناسی)	عضو هیأت علمی دانشگاه تهران
نوربخش، رویا (کارشناسی ارشد سم شناسی)	کارشناس سازمان استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسه استاندارد	ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
پیش‌گفتار	ه
مقدمه	و
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ اصطلاحات و تعاریف	۱
۳ اختصارات	۴
۴ ملاحظات پیش از آزمون	۵
۵ نمونه آزمون	۶
۶ آماده سازی نمونه آزمون	۶
۷ روش های آزمون	۱۰
۸ ارزیابی نتایج	۱۴
۹ گزارش آزمون	۱۵
پیوست الف (اطلاعاتی) – نمونه‌هایی از تداخلات بالقوه با آزمون LAL	۱۶
پیوست ب (اطلاعاتی)- روش ژل-توده	۱۸
پیوست پ (اطلاعاتی)- روش نقطه پایانی فتومتریک	۲۳
پیوست ت (اطلاعاتی)- **روش سینتیک**	۲۸
پیوست ث (اطلاعاتی)- کتابشناسی	۳۴

پیش‌گفتار

استاندارد"فناوری نانو - آزمون اندوتوکسین نانومواد در سیستم‌های برون‌تن - روش آزمون Limulus Amebocyte Lysate(LAL)" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط ستاد توسعه فناوری نانو مستقر در دفتر همکاری‌های فناوری ریاست جمهوری تهیه و تدوین شده و در ۲۹۲ اجلاس کمیته ملی استاندارد میکروبیولوژی و بیولوژی مورخ ۱۳۹۰/۸/۳ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرارگرفته به شرح زیر است:

ISO 29701:2010, Nanotechnologies- Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems- Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test

مقدمه

اندوتوکسین‌ها (لیپوپلی ساکاریدها) قسمتی از لایه خارجی دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلای[1]، سالمونلا[2]، شیگلا[3]، سودوموناس[4]، نیسریا[5] و هموفیلوس[6] هستند. اندوتوکسین‌ها می‌توانند سبب واکنش‌های سیستمیک مختلفی مانند تب، انعقاد منتشر داخل عروقی، کاهش فشارخون، شوک و مرگ در پستانداران و انسان شوند. این پاسخ‌ها بوسیله تولید انواع مختلفی از سایتوکاین‌ها[7]، فعال شدن مسیرهای آبشاری کمپلمان ها[8]، فعال شدن مسیرهای آبشاری انعقادی[9] و غیره رخ می‌دهند. اندوتوکسین‌ها در محیط‌های عادی هم وجود دارند. با توجه به اینکه بیشتر نمونه‌های نانومواد که به منظورانجام آزمون های برون‌تن[10] ویا درون‌تن[11] انتخاب می‌شوند، نیازمند فرایندهای آماده‌سازی مختلفی هستند، در صورت عدم مراقبت ویژه ممکن است بوسیله اندوتوکسین ها آلوده شوند.

به منظور غربال‌گری سمیت یا انجام آزمون‌های سازگاری زیستی نانومواد، یا مطالعات روی مکانیسم‌های احتمالی سمیت القا شده بوسیله آن‌ها انواع روش‌های آزمون سلولی برون‌تن و درون تن توسعه یافته و بکارگرفته شده‌اند. در روش‌های آزمون‌های برون تن اغلب ماکروفاژها ویا سایر سلول‌های مربوط به پستانداران به عنوان سلول‌های مورد آزمون برای نانو مواد استفاده می‌شوند زیرا سلول‌های مذکور عامل اولیه حفظ و بقای سلول‌ها در بدن هستند. از آنجائیکه سلول‌های

1- E.coli
2- Salmonella
3-Shigella
4 -Pseudomonas
5- Neisseria
6- Haemophilus
7-Cytokines
8- Activation of the complement cascade
9- Ativation of the coagulation cascade
10- in vitro
11- in vivo

ماکروفاژی به اندوتوکسین‌ها واکنش‌های شدیدی نشان می‌دهند. لذا، تشخیص اینکه این پاسخ مربوطه به واکنش اندوتوکسین است یا نانو مواد مشکل است.

در نتیجه آلودگی با اندوتوکسین‌ها می‌تواند نتایج آزمون‌های برون تن را با اشکال مواجه کند. اگر در هنگام آماده‌سازی نمونه‌های آزمون احتیاط رعایت شود، احتمالا آلودگی با اندوتوکسین‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین برای به حداقل رساندن آلودگی و یا به قطعیت رساندن مقادیر ناچیز اندوتوکسین‌ها در نمونه آزمون تشخیص مقدماتی آن‌ها ضروری است. برای تفسیر مناسب داده‌هایی که از آزمون برون تن بدست می‌آید بسیار مهم است که مقدار اندوتوکسین‌ها تعیین شود. از آنجائیکه اندوتوکسین‌ها می‌توانند تجهیزات پزشکی و یا داروهای تزریقی را آلوده کنند، روش‌های اندازه‌گیری نیمه کمی و کمی اندوتوکسین‌ها به دوشکل برون تن و درون تن توسعه یافته اند. (به پیوست ث مرجع۶ مراجعه کنید). آزمون اندوتوکسین باکتریال با استفاده ازواکنشگر Limulus amebocyte lysate(LAL) بعنوان یک روش برون تن جهت ارزیابی آلودگی به اندوتوکسین‌ها توسعه یافته است. این آزمون می‌تواند روش جایگزینی برای آزمون تب‌زایی در خرگوش‌ها و سایر روش‌های شرح داده شده در فارماکوپه بسیاری از کشورها باشد. این استاندارد نکاتی را ارائه می‌کند که برای آزمون LAL جهت نانومواد بکار رفته در انجام آزمون‌های بیولوژیکی برون‌تن استفاده می‌شود.

"فناوری نانو – آزمون اندوتوکسین نانومواد در سیستم‌های برون‌تن- روش آزمون "Limulus Amebocyte Lysate(LAL)[1]

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارائه کاربرد یک آزمون با استفاده از واکنشگر LAL جهت ارزیابی نانومواد مورد نظر در سیستم های آزمون‌های بیولوژیکی برون تن بر پایه سلولی می‌باشد. این آزمون برای استفاده نمونه‌های نانو مواد توزیع شده در محیط‌های آبی مانند آب، سرم، یا محیط واکنش و همچنین محیط‌های گرمخانه گذاری[2] شده با نانومواد برای یک دوره زمانی لازم در ۳۷°C مناسب است. این استاندارد به نمونه‌های آزمون برای سیستم‌های برون‌تن محدود می‌شود، اما روش‌های ارائه شده همچنین می‌توانند برای نانو مواد تزریق شده به حیوانات هم تعمیم یابند.

۲ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود.

۲-۱

کواگولوژن [3]

پروتئینی لخته شونده در LAL است که نقش مرکزی در تشکیل ژل توده[4] به‌وسیله اندوتوکسین‌ها را ایفا می‌کند.

یادآوری -کواگولوژن از خرچنگ ژاپنی[1] متشکل از مجموع ۱۷۵ اسید امینه با وزن ملکولی ۷۲۳/ ۱۹مشتق شده است. (به پیوست ث، مرجع ۷ مراجعه کنید).

1-Limulus AmebocyteLysate test
2- Incubated
3-Coagulogen
4- Gel-clot

۲-۲

کوآگولین[۲]

اجزاء بدست آمده از کواگولوژن بعد از پروتئولیز محدود شده توسط آنزیم ا نعقادی در LAL است.

یادآوری - کواگولین A از Japanese horseshoe crab (Tachypleus Tridentatus) متشکل از پپتیدهای بخش N-terminal(Ala1-Arg18) و پپتیدهای بخش C-terminal (Gly47- PHe175) مشتق شده است. (به پیوست ث، مرجع ۷ مراجعه کنید).

۲-۳

اندوتوکسین

بخشی از غشاء خارجی پوشش سلولی باکتری‌های گرم منفی است.

یادآوری- بخش فعال اصلی لیپوپلی ساکاریدها[۳] هستند.

۲-۴

واحد اندوتوکسین [۴]

UE واحد استاندارد فعالیت اندوتوکسین

یاد آوری۱- در سال ۱۹۹۶ واحد اندوتوکسین توسط کمیته تخصصی سازمان بهداشت جهانی در حوزه استانداردسازی نمونه‌های بیولوژیک [۵]تعریف شد که متناسب با فعالیت ۰/۱ نانوگرم از اندوتوکسین مرجع استاندارد سازمان جهانی بهداشت [۶] از اشرشیاکلای با کد (-) K :۱۰ HK:۰۱۱۳ یا ۱۰EU/ng است. ((به پیوست ث، مرجع ۸ مراجعه کنید).

1- Japanese horseshoe crab
2- Coagulin
3- Lipopolysaccharid (LPS)
4- Endotoxin unit (EU)
5- ECBS
6- Reference Standard Endotoxin (RSE)

یادآوری۲- EU معادل با واحد بین المللی (IU) اندوتوکسین است.

۲-۵

لاندا(λ)

حساسیت قید شده LAL (که با برچسب مشخص شده است) برای روش لخته ژلی یا پایینترین غلظت اندوتوکسین روی منحنی استاندارد برای روش‌های رنگ زایی [۱]یا کدورت سنجی[۲] که بصورت EU/ml بیان می شود.

۲-۶

LAL

عصاره آبی سلول پرتو پلاسمی [۳] خون خرچنگ ژاپنی است.

۲-۷

آزمون LAL

آزمونی برای اندازه گیری اندوتوکسین های باکتری یایی با استفاده از واکنشگر LAL است.

یاد آوری- آزمون LAL در فارماکوپه BET[۴] نامیده می‌شود.

۲-۸

چگالی نوری[۵]

جذب نوری یک عنصر نوری برای یک طول موج مشخص در واحد فاصله است.

1- Chromogenic methods
2 -Turbidometric method
3 -Corpuscle
4 -Bacterial Endotoxin TesT
5- Optical density(OD)

۲-۹

نمونه آزمون

پراکندگی آبی یا عصاره آبی نانو مواد تحت بررسی است.

۳ اختصارات

BET- آزمون اندوتوکسین باکتریایی

CSE[1] – اندوتوکسین استاندارد کنترل

ECBS[2] –کمیته تخصصی استانداردسازی بیولوژیکی

EF[3]– فاقد اندوتوکسین

EU - واحد اندوتوکسین

I/EC[4] –کنترل مهاری/ افزایشی

limulus amebocyte lysate test – LAL

LPS – لیپوپلی ساکارید

OD – چگالی نوری

RSE – اندوتوکسین استاندارد مرجع

WHO[5]- سازمان بهداشت جهانی

1 - Control standard endotoxin
2- Expeer committee on biological standardization
3 - Endotoxin-free
4- Iinhibition/enhancement contro
5 -World Health Organization

۴ ملاحظات پیش از آزمون

۴-۱ ذخیره سازی نانو مواد

نانومواد به علت مساحت سطحی بالا می‌توانند بسیاری از آلودگی‌ها شامل اندوتوکسین‌ها را از محیط جمع آوری کنند. به این دلیل نانومواد باید از ورود تا هنگام استفاده در ظروف در بسته فاقد اندوتوکسین(مانند شیشه آلات) جمع آوری و ذخیره شوند. نمونه شاهد[1] مناسبی مانند پودرهای اکسید فلزات فاقد اندوتوکسین از جمله تیتانیوم دی‌اکساید و سیلیکون‌دی‌اکساید و غیره باید استفاده شوند تا عدم حضور آلودگی اندوتوکسین تایید شود.

یادآوری ۱- توصیه می‌شود که از پلاستیک‌هایی مانند پلی پروپیلن برای ذخیره‌سازی نانو مواد به علت امکان تداخل با آزمون LAL اجتناب شوند.(همانطور که در پیوست الف نشان داده شده است)

یادآوری ۲- پودرهای اکسید فلزی فاقد اندوتوکسین می توانند بوسیله عملیات حرارتی به دست بیایند. (به پیوست ث، مرجع ۲-۴ مراجعه کنید)

۴-۲ ظروف ذخیره سازی

جهت حذف اندوتوکسین ها ، ظروف شیشه ای و سایر ظروف ذخیره سازی نانو مواد و نمونه‌های آزمون را به وسیله گرم کردن در دمای بالاتر از $۲۵۰\ ^{o}C$ برای حداقل ۳۰ دقیقه و یا سایر تناسبهای صحه‌گذاری شده دمایی و زمانی (دمای $۱۸۰^{o}\ C$ برای حداقل ۳ ساعت و یا $۶۵۰^{o}C$ برای ۱ دقیقه) آماده کنید. ظروف پلی‌استایرن استریل فاقد اندوتوکسین که به صورت تجاری قابل دسترس هستند می‌توانند استفاده شوند.

۴-۳ کار کردن با نانو مواد

2-Blank

گرد و غباری که در محیط داخلی یافت می‌شود معمولا شامل مقادیر قابل توجهی از اندوتوکسین ها می‌باشد.

توجه ویژه‌ای باید صورت گیرد تا از تماس بین نانو مواد و گرد و غبار در طول نمونه برداری و کار کردن جلوگیری شود. محیط آزمایشگاهی با هوای پاک برای انجام آزمون ضروری است. (به پیوست ث، مرجع ۵و۶ مراجعه کنید).

۵ نمونه آزمون

۵-۱ پراکندگی آبی

نانومواد پراکنده شده در محیط آبی را به طور مستقیم یا پس از رقیق کردن با آب فاقد اندوتوکسین جهت آزمون LAL بکار گیرید.

۵-۲ عصاره آبی

محیط واکنش فاقد اندوتوکسین، محلول سالین فیزیولوژیک یا سایر پایه‌های استخراج گرمخانه‌گذاری شده با نانومواد را به عنوان نمونه آزمایش برای آزمون LAL بکار گیرید.

۶ آماده سازی نمونه آزمون

۶-۱ روش پراکنش[1]

پراکنش نمونه آزمون می‌تواند بوسیله روش‌های زیر باشد:

- خرد کردن با دست

-آسیاب کردن مکانیکی

- اولترا سونیک

1 - Dispersion method

نوع محیط پراکنش به هدف و ویژگی آزمون برون تن بستگی دارد.

یاد آوری- نانو مواد به علت مساحت سطحی بالا، تخلخل، آب‌گریزی[1] و سایر ویژگی‌ها می‌توانند این مرحله را مشکل کنند.

۶-۲ روش استخراج

شرایط استخراج مانند محیط‌های استخراج، زمان انکوباسیون ، دمای انکوباسیون ، و غلظت نمونه آزمون ممکن است شرایط گرمخانه‌گذاری آزمون برون تن مر بوط را شبیه‌سازی کند. جهت جلوگیری از تداخل با رنگ، محیط‌های واکنش فاقد واکنشگر pH (به عنوان مثال فنول قرمز) یا بافر سالین برای محیط استخراج ارجعیت دارد. محیط واکنش باید فاقد اندوتوکسین باشد یا از واکنشگرهای فاقد اندوتوکسین بازسازی شده باشد.

افزودن آنتی بیوتیک‌ها و ضد قارچ‌ها به محیط استخراج ممکن است به ترتیب جهت جلوگیری از رشد باکتری ا و قارچ ا موثر باشد. تاثیرات مداخله‌ای عوامل آنتی بیوتیک اضافه شده به آزمون LAL باید ارزیابی شود. پس از استخراج مخلوط استخراج شده باید سانتریفوژ شود و محلول فوقانی روی آب که به عنوان نمونهٔ آزمون برای آزمون LAL به کار گرفته می‌شود در لوله‌ها یا ظروف و سرسمپلرهای فاقد اندوتوکسین جمع‌آوری شود. شرایط استخراج شامل سانتریفوژ باید تنظیم و ثبت شود. شرایط سانتریفوژ باید مطابق با نانو مواد مربوط تعیین شود.

یاد آوری۱- پلی سوربات ۲۰ ۰/۰۵٪ به عنوان یک پایه استخراج برای اندوتوکسین هوازاد[2] از فیلترهای فیبر شیشه‌ای پیشنهاد شده است.

1-Hydrophobocity
1- Airborne

یادآوری۲- ثابت شده است که سورفکتانت ویتامین E ۰.۱٪ (vitamin E d-α-tocopHeryl polyethylene glycol-100 succinate) استخراج اندوتوکسین از مواد نانو کربن را بهبود می‌بخشد.

یادآوری ۳- برای اطلاعات بیشتر در مورد روش‌های استخراج به استاندارد ISO-10993-12:2007 مراجعه شود.

۶-۳ غلظت

اگر لازم باشد، نمونهٔ آزمون باید در آب فاقد اندوتوکسین با بالاترین غلظت در آزمون برون‌تن بر پایه سلولی بازسازی شود.

۶-۴ ذخیره سازی نمونهٔ آزمون

در صورت امکان، نمونهٔآزمون باید بلافاصله بعد از آماده‌سازی آزمایش شود زیرا ممکن است کاهش اندوتوکسین ها در نمونه آزمون یا رشد باکتریایی در طول ذخیره اتفاق بیافتد. نمونه آزمون باید در یک ظرف دربسته فاقد اندوتوکسین در دمای بین$2\ ^{o}C$ تا $8^{o}C$ ذخیره شود. اگر نمونه آزمون بیشتر از ۲۴ ساعت ذخیره شود باید پایداری و یکنواختی نمونه آزمون تحت شرایط ذخیره‌سازی تعیین شود

۶-۵ محیط آزمایشگاه

۶-۵-۱ پاکیزگی هوا و آب شیر

آب شیر و گرد و غباری که در محیط داخلی یافت میشود معمولا شامل مقادیر قابل توجهی از اندوتوکسین‌ها است. نانومواد باید با محیط و ظروف آزمایشگاهی فاقد اندوتوکسین فراوری شوند تا از آماده‌سازی نمونه در شرایط آسپتیک اطمینان حاصل شود. یک اطاق تمیز، یک هود هوای تمیز یا یک وسیله هوای تمیز معادل با پاکیزگی کلاس ۵ ایزو باید در شرایط آزمایشگاه استفاده شود. برای راهنمایی در باره پاکیزگی هوا به استانداردهای ISO-14644-1,ISO-14644-2، مراجعه شود.

۶-۵-۲ وسایل وظروف آزمایشگاه

جهت حذف اندوتوکسین‌ها وسایل و ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی مورد استفاده برای آماده‌سازی نمونه آزمون باید به وسیله حرارت دادن در دمای بالاتر از ۲۵۰^{o} C برای حداقل ۳۰ دقیقه و یا سایر تناسب‌های صحه‌گذاری شده دمایی و زمانی (دمای ۱۸۰^{o} C برای حداقل ۳ ساعت و یا ۶۵۰^{o} C برای ۱ دقیقه) آماده سازی شوند. یک روش قابل اعتماد جهت حذف اندوتوکسین‌ها شستشو با آب فاقد اندوتوکسین بعد از غوطه‌ور شدن مواد در محلول اکسیدکننده یا قلیایی قوی است.

اگر از محلول اکسیدکننده یا قلیایی قوی استفاده شود لازم است که روش صحه‌گذاری شود تا موجب کاهش ظهور اندوتوکسین شود و هیچ باقیمانده‌ای بعد از آماده‌سازی نمونه وجود نداشته باشد.

۳-۵-۶ آبکشی

آب یکی از منابع اندوتوکسین‌ها است که در وسایل و ظروف آزمایشگاهی یافت می‌شود. می‌توان از آب مقطر برای شستشوی وسایل و ظروف آزمایشگاهی بعد از کاهش اندوتوکسین ها استفاده کرد. اما آب مقطر آماده شده درآزمایشگاه ممکن است به علت تجهیزات یا کنترل نامناسب با اندوتوکسین ها آلوده شود، گر چه ثابت شده است که تقطیر در حذف اندوتوکسین ها از آب آلوده موثر است. سطح اندوتوکسین در آب مقطر آماده شده در آزمایشگاه باید به طور متناوب اندازه‌گیری شود تا مشخص شود که حاوی میزان قابل اغماض از اندوتوکسین‌ها است. اگر الودگی آب مقطر با اندوتوکسین غیرقابل اجتناب باشد، باید آب فاقد اندوتوکسین که به صورت تجاری در دسترس است استفاده شود.

۷ روش‌های آزمون

۷-۱ اساس روش

اندوتوکسین‌ها فاکتوری را در LAL فعال می‌کنند و موجب فعال شدن یک آبشار پروتئولیتیک میشود. آنزیم انعقادی که به وسیله یکی از فاکتورهای فعال شده و از یک آنزیم پیش انعقادی آزاد می‌شود، پروتئولیز کواگولوژن را در LAL کاتالیز میکند و قطعات به دست آمده، کواگولین‌ها, از طریق باند دی‌سولفید به طور خود به خودی به یکدیگر اتصال می‌یابند تا باعث گسترش کدورت LAL شوند و سرانجام یک لخته ژلی تشکیل شود. تشکیل لخته ژلی اصولا بعد از واژگون کردن لوله‌های آزمون به وسیله بررسی چشمی تعیین می‌شود.

این روش نیازمند هیچ وسیله سنجش نوری [1]نمی‌باشد و فرایندها به آسانی انجام می‌شوند. حساسترین روش لخته ژلی با استفاده از واکنشگرهایی که به صورت تجاری در دسترس هستند EU /ml ۰/۰۱۵ را اندازه‌گیری می‌کند.

یادآوری- یکی از روش‌های کاربردی برای روش لخته ژلی در پیوست ب شرح داده شده است.

۷-۲ روش‌های آزمون جایگزین

۷-۲-۱ روش‌های فوتومتریک نقطه پایانی [2]

چگالی نوری مخلوط واکنش پس از طی یک دوره مشخص از زمان واکنش اندازه‌گیری می‌شود.

با توجه به روش‌های فوتومتریک نقطه پایانی دو تکنیک وجود دارد:تکنیک کدورت سنجی که در آن کدورت مخلوط واکنش اندازه گیری میشود و تکنیک رنگ سنجی که در آن (P-NA) آزاد

1- Optical Reader
2- End Point PHotometric method

شده از یک سوبسترای مصنوعی[1]، مانند: Boc-Leu-Gly-Arg-p-NA or Boc-Thr-Gly-Arg-p-NA برای آنزیم انعقادی اندازه‌گیری می‌شود. با توجه به حساسیت پایین و مشکل تکنیکی توقف روند تولید کدورت در یک نقطه زمانی طراحی شده، روش کدورت سنجی ساده با روش کدورت سنجی سینتیک شرح داده شده در بند ۷-۲-۲ جایگزین می‌شود .حداقل دو روش برای اندازه گیری P-NA در مخلوط واکنش وجود دارد:

۷-۲-۱- ۱ در یک روش چگالی نوری p-NA در طول موج ۴۵۰ نانومتر مستقیما" اندازه‌گیری می‌شود.

۷-۲-۱-۲ در روش دیگر رنگ قرمز ناشی از مشتق دی ازته p-NA در طول موج بین ۵۴۰ و ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود.

حساسیت روش فوتومتریک نقطه پایانی با استفاده از واکنشگرهایی که به صورت تجاری در دسترس هستند به وسیله اندازه گیری چگالی نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر eu/ml ۰٫۰۱ است در حالی که حساسیت روش جفت دی آزو eu/ml[2] ۰٫۰۰۱ است.

یاد آوری- یکی از روش‌های کاربردی برای روش فوتو متریک نقطه پایانی در پیوست ت شرح داده شده است.

۷-۲-۲ روش‌های سینتیک

زمان لازم برای رسیدن به چگالی نوری از پیش تعیین شده مخلوط واکنش یا سرعت گسترش کدورت یا رنگ به وسیله یک نور سنج تعیین می‌شود. در روش های سینتیک،چگالی نوری

1-Synthetic substrate

2- Diazo coupling

p-NA آزاد شده از پپتید سنتزی بیان شده در بالا یا کدورت مخلوط واکنش در چند نقاطه زمانی خوانده می‌شود و بنابر این انواع وسایل اتوماتیک پیشرفته‌ای ابداع شده است. کمترین حساسیت روش سینتیک با استفاده از یک وسیله خودکار که به صورت تجاری در دسترس است ۰٫۰۰۱ EU/ML است.

یاد آوری- یکی از روش‌های کاربردی برای روش کینتیک در پیوست پ شرح داده شده است.

۷-۳ صحه گذاری و انتخاب روش آزمون

۷-۳-۱ حداقل حساسیت مورد نیاز

غلظت بحرانی برای اندوتوکسین‌ها در سیستم های آزمون برون تن برای تولید واکنش‌های بیولوژیکی بر اساس سیستمی که بکار می‌رود متغیر است. مقدار ng ۰٫۰۱ اندوتوکسین IL-1 و TNFرا در ماکروفاژهای انسان القا میکند درحالی که ng ۰٫۰۴۸ اندوتوکسین پاسخ های زیستی نامحسوسی را در سلول های دندریتیک انسان یا سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی القا می‌کند. توصیه می‌شود که سطح آلودگی مجاز اندوتوکسین‌ها در سیستم‌های آزمون برون تن را بدانید تا آزمون LAL مناسب را انتخاب کنید. حساسیت واکنشگر LAL باید پایین‌تر یا حداقل معادل با سطح الودگی مجاز در آزمون برون‌تن باشد.

۷-۳-۲ پتانسیل مهاری/افزایشی جهت آزمایش با نمونه آزمون

۷-۳-۲-۱ گزارش شده است که چندین ماده با آزمون LAL تداخل می‌کنند. بعضی از نانو مواد ممکن است به تازگی سنتز شده باشند و به علت ویژگی‌هایشان اثرات بالقوه مهاری/افزایشی ناشناخته ای روی آزمون LAL داشته باشند.

یادآوری- مثال‌هایی از تداخلات بالقوه در پیوست الف بیان شده است.

۷-۳-۲-۲ وقتی که روش‌های فوتومتریک نقطه پایانی یا روش‌های سینتیک را به کار می‌برید، تداخل با رنگ یا کدورت نمونه آزمون را مورد توجه قرار دهید. روش آزمون را مطابق با ویژگی نوری نمونه آزمون انتخاب کنید.

۷-۳-۳ صحه گذاری روش آزمون

۷-۳-۳-۱ تاثیرات مداخله‌ای نانومواد روی آزمون اندوتوکسین می‌تواند به وسیله آزمایش کردن رقت‌های متوالی از نمونه آزمون با و بدون یک مقدار مشخص از اندوتوکسین تلقیح شده امتحان شود.

یاد آوری ۱- روش‌های راهنما برای صحه گذاری آزمون در پیوست الف و ب و پ شرح داده شده است.

یادآوری ۲- برای اطلاعات بیشتر درباره صحه گذاری روش‌های آزمون فارماکوپه را مطالعه کنید.

۷-۳-۳-۲ واکنش LAL در pH بهینه ۶ تا ۸ اتفاق می‌افتد. زمانی که آزمون مهار شود اندازه‌گیری pH را روی مخلوط واکنش شامل نمونه آزمون ولیزات با استفاده از یک سیستم pH متری مناسب انجام دهید. اگر تنظیم pH لازم باشد، pH نمونه آزمون را تنظیم کنید تا pH مخلوط واکنش در محدوده pH گفته شده قرار بگیرد.

یادآوری ۱- به منظور تنظیم pH می‌توان از بافر تریس (Tris) ، و Na(OH) 0.1 نرمال یا HCL۰.۱ نرمال فاقداندوتوکسین استفاده کرد.

یاد آوری ۲- نمک‌های بوجود آمده در طول تنظیم pH می‌توانند با واکنش LAL تداخل ایجاد کنند.

۷-۴ روش‌های آزمون

یکی از روش‌های آزمون شرح داده شده به عنوان آزمون اندوتوکسین باکتریایی (BET) یا (BE) در آخرین ویرایش فارماکوپه کشورهای آمریکا، اروپا و ژاپن را، استفاده کنید.

۸ ارزیابی نتایج

۸-۱ کلیات

هنگام ارزیابی نتایج آزمون LAL روی نانو مواد ، با توجه به محدودیت آزمون باید قضاوت علمی خوبی بکار گرفته شود.

در نظر گرفتن ماهیت تداخل نانو مواد روی آزمون LAL از اهمیت خاصی برخودار است. در چنین مواردی محدودیت‌های پذیرفته شده تاثیرات مداخله‌ای باید بررسی شده و اطلاعات به دقت تفسیر شود.

۸-۲ راهنمای کاربرد آزمون

۸-۲- ۱ اگر از طریق رقیق کردن نمونه آزمون یا سایر اندازه‌گیری‌ها نتوان به طور موفقیت آمیز به تداخل فائق شد، آزمون LAL برای چنین نمونه‌ای کاربرد ندارد.

۸-۲- ۲ هنگامی که آلودگی با اندوتوکسین‌ها غیر قابل اجتناب است، می‌توان با مواجه نمونه آزمون با واکنشگرهایی مانند پلی میکسین B اثرات ایجاد شده به وسیله اندوتوکسین‌ها را حذف کرد(به پیوست ث مراجع ۱۳ و ۱۴ مراجعه کنید).

۸-۲- ۳ بدیهی است که سرم ممکن است با B-1 ،3-glucan ناشی از مخمر، قارچ و یا سایر میکروب‌ها آلوده شود، و اینکه یک واکنشگر معمول LAL علاوه بر اندوتوکسین ها با glucan-B-1,3 واکنش دهد (به پیوست ث مرجع ۱۲ مراجعه کنید). اکیدا توصیه شده است که B-1,3-glucan آزاد سرم برای آماده سازی نمونه‌های آزمون بکار رود.

وقتی که احتمال آلودگی با B-1,3-glucan وجود داشته باشد توصیه می‌شود واکنشگرهای LAL ویژه اندوتوکسین را که با B-1,3-glucan واکنش نمی‌دهد استفاده کنید.

۹ گزارش آزمون

۹-۱ گزارش آزمون باید با روش‌های استفاده شده مطابقت داشته باشد.

۹-۲ گزارش آزمون باید شامل موارد زیر باشد:

الف- نتایج آزمون؛

ب- فرایندهای آزمون؛

پ- مشخصات کامل فیزیکی و شیمیایی نانو مواد مورد آزمون؛

ت- روش‌های آماده سازی نمونه آزمون، شرایط ذخیره‌سازی نمونه آزمون، و اطلاعاتی درباره طبقه‌بندی محیط آزمایشگاهی بکار رفته؛

ث- مشخصات واکنشگر LAL : (کدسازنده، برگ شناسایی، یا شماره فرمولاسیون، شماره سری ساخت یا تاریخ ساخت، نام تجاری، حساسیت و غیره)؛

ج- مشخصات اندوتوکسین استاندارد : (نام تجاری, کدسازنده, برگ شناسایی، یا شماره فرمولاسیون، شماره سری ساخت یا تاریخ ساخت، ، شدت اثر [1] و غیره)؛

ح- اعتبارآزمون با در نظر گرفتن تداخلاتی که به وسیله نمونه آزمون ایجاد می‌شود.

یاد آوری- برای اطلاع درباره سوابق به استاندارد ISO-10993-12:2007 مراجعه شود.

1 -Potency

پیوست الف

(اطلاعاتی)

نمونه‌هایی از تداخلات بالقوه با آزمون LAL

الف-۱ مهار

الف ۱-۱ نمک‌ها (CH3COONa (0,3M), NaHCO3 (0,1M), KCl (50mM), NaCl (0,6M) به پیوست ث مرجع ۱۷ مراجعه کنید).

یاد آوری- قابل برگشت : با رقیق سازی نمونه آزمون از مهار جلوگیری می‌شود.

الف ۱-۲ هپارین (به پیوست ث مرجع ۱۸ مراجعه کنید).

یادآوری- قابل برگشت(بااضافه کردن یون سدیم(Na^{+}) و کلسیم(Ca^{+2}) از مهار جلوگیری می‌شود). می‌توانید از یک بافر کاتیونی فاقداندوتوکسین تجاری استفاده کنید تا از مهار جلوگیری شود.

الف ۱-۳ یون‌های فلزی Fe2+, Fe3+, Cr3+, Al3+.

یادآوری- برگشت‌ناپذیر: اضافه کردن (سدیم – ادتا[1]) تا حدی فعالیت رابازیابی می‌کند.

الف ۱-۴ پلاستیک‌ها (پلی پروپیلن)(به پیوست ث مرجع ۲۱ مراجعه کنید).

الف ۱-۵ ذرات فعال شده با آمونیوم چهار ظرفیتی(به پیوست ث مرجع ۲۲ مراجعه کنید).

1- EDTA- Na

الف ۶-۱ صافی های ذرات: سلولز استر (به پیوست ث مرجع ۲۳ مراجعه کنید).

الف ۷-۱ مهار کننده‌های پروتئاز (به پیوست ث مرجع ۲۴ مراجعه کنید).

الف ۸-۱ پلی سوربات ۲۰ (به پیوست ث مرجع ۲۵ مراجعه کنید).

یادآوری- قابل برگشت :رقیق سازی نمونه آزمون از مهار جلوگیری میکند.

الف-۲ افزایشی

الف-۲-۱ EDTA-4Na (به پیوست ث مرجع ۱۹ مراجعه کنید).

یادآوری ۱- تاکنون مکانیسم آن مشخص نشده است.

یادآوری ۲- اگر چه غلظت بالای EDTA-Na می‌تواند واکنش LAL مهار کند، اما به علت فعالیت شلاتوری آن با کاتیون‌های دو ظرفیتی که در واکنش آزمون مورد نیاز است هیچ تداخلی افزایشی/مهاری با آزمون LAL به وسیله EDTA-2Na or -3Na تا غلظت ۰/ ۵ mm در مخلوط مواد واکنش دهنده دیده نمی‌شود.(به پیوست ث مرجع ۱۹ مراجعه کنید).

پیوست ب

(اطلاعاتی)

روش ژل-توده

ب-۱ کلیات

این پیوست مثالی از روش‌های روش ژل- توده با استفاده از واکنشگر آماده شده LAL در لوله-های آزمون را توضیح می‌دهد.

ب-۲ واکنشگرها

ب-۲-۱ لوله‌های آزمون حاوی واکنشگر آماده شدهLAL برای روش ژل - توده با حساسیت λ.

ب-۲-۲ آب فاقد اندوتوکسین(Ef-water)

ب -۲-۳ اندوتوکسین استاندارد کنترل لیوفیلیزه شده(CSE)

یاد آوری- واکنشگر LAL لیوفیلیزه شده به طور تجاری در دسترس است و همچنین کاربران خودشان می‌توانند آن را آماده کنند.

ب- ۳ وسایل

ب-۳-۱ ظروف شیشه‌ای یا و ظروف پلی‌استایرن فاقد اندوتوکسین برای تهیه کردن رقت‌های استاندارد اندوتوکسین یا نمونه آزمون.

ب-۳-۲ جا لوله‌ای برای نگهداری کردن یا گرمخانه‌گذاری لوله‌های واکنش

ب-۳-۳ انواع پیپت‌ها و پیپتورهای خودکار و پیپتورهای سریالی با سر سمپلر

ب-۳-۴ حمام آبی غیر گردشی [1]یا گرمخانه خشک [1]با قابلیت نگهداری دمای در ^{o}C (۱±۳۷)

1- Non-circulating water bath

ب-۳-۵ همزن نوع ورتکس[۲]

ب-۳-۶ زمان سنج

ب- ۴ آماده سازی محلول اندوتوکسین استاندارد

ب-۴- ۱ آماده سازی محلول مادر[۳]

محلول CSE به صورت پودر لیوفیلزه شده باید استفاده شود. جهت ساختن محلول مادر CSE محتویات ویال CSE باید با EFW حل شود. غلظت دقیق ویال روی گواهی همراه آن درج خواهد شد.

ب-۴-۲ آماده سازی استانداردهای کالیبره

استاندارد کالیبره باید به وسیله رقیق کردن CSE با E-FW آماده شود. استانداردهای کالیبره باید شامل ۴ غلظت ۰٫۲۵ و ۰٫۵ و ۱ و ۲ λ باشد. در هر غلظتی فاکتور رقت محلول CSE نباید بیش از ۱۰ شود تا خطای ناشی از استفاده پیپیت[۴] کمتر شود.

ب- ۵ آماده سازی کنترل مهاری/افزایشی (I/EC) ۰٫۲۵

محلول کنترل مهاری/افزایشی را بوسیلهٔ رقیق کردن محلول اندوتوکسین استاندارد کنترل با نمونه آزمون غیر رقیق شده آماده کنید. غلظت محلول کنترل مهاری/افزایشی باید شامل ۴ غلظت **۰٫۲۵**و ۰٫۰۵ و ۱ و ۲ λ باشد. جهت اجتناب از رقیق شدن زیاد نمونه آزمون مقدار CSE برای محلول افزایشی[۵] نباید بیش از ۵٪ شود. (به طور مثال: مقدار محلول CSE برای محلول افزایشی نباید بیش از 50µl در حجم کل ۱ml از محلول I/EC باشد).

ب-۶ رقیق سازی نمونه آزمون

یک سری رقت‌های ۲ برابر (۲ , ۴, ۸ یا بیشتر در صورت نیاز) از نمونه آزمون با EF-water با ید آماده شود.

---

1 -Dry block incubator
2- Vortex type mixer
3- Stock
4- Pipetting error
5 - Spike

ب-۷ روش‌های اجرایی آزمایشگاهی

ب-۷-۱ تایید حساسیت قید شده (درج شده روی برچسب) واکنشگر LAL

ب-۷-۱-۱ حجم مشخصی از EF-water (کنترل منفی) تجاری یا استاندارد کالیبره سازنده (۰٫۲۵ و ۰٫۰۵ و ۱ و ۲ λ در EF-water) را با دقت در یک لولهٔ آزمون آغشته با واکنشگر LAL برای ارزیابی ژل- توده ریخته و مخلوط کنید.هراندازه گیری را چهاربار تکرار کنید.

ب-۷-۱-۲ لوله‌های آزمون را در یک حمام آبی غیر گردشی یا گرمخانه خشک در دمای ۳۷^{o} C برای ۶۰ دقیقه نگهداری کنید, از ویبره کردن اجتناب کنید.

ب-۷-۱-۳ برای اینکه یکپارچگی تشکیل ژل را بعد از گرمخانه‌گذاری آزمایش کنیم، هر لوله باید ۱۸۰ درجه در یک حرکت آرام برعکس شود. اگر ژل بسته شده باشد و با برعکس شدن در مکانش باقی بماند نتیجه را مثبت گزارش کنید. اگر یک ژل سخت بسته نشده باشد یا اگر یک ژل شکننده شکل گرفته باشد که با برعکس شدن جریان می‌بابد نتیجه را منفی گزارش کنید.

ب-۷-۱-۴ آزمون زمانی معتبر است که هر دو کنترل منفی(EF-water) و پایین‌ترین غلظت استاندارد کالیبره (۰٫۲۵ λ) منفی هستند.

ب-۷-۱- ۵ پایین‌ترین غلظتی که بازده نتیجه مثبت را دارد به عنوان غلظت نقطه پایانی تعریف می‌شود. میانگین هندسی ۴ غلظت نقطه پایانی، c، در استاندارد کالیبره به عنوان حساسیت واکنشگر LAL درEF-water طبق فرمول زیر به دست می‌آید:

$$c = \text{antilog}\,[\sum e / F] \qquad (۱)$$

که در آن:

$\sum e$:جمع لگاریتم غلظتهای نقطه پایانی رقت‌های متوالی استفاده شده است.

F: تعداد اندازه گیری‌ها است.

ب ۷-۱-۶ حساسیت واکنشگر LAL در EF-water باید در دامنه ۰٫۰۵ تا ۲ λ باشد.

یادآوری- توصیه می‌شود که حساسیت قید شده در برچسب واکنشگر LAL تایید شود.

ب-۷- ۲ صحه گذاری روش آزمون

ب-۷-۲-۱ حجم مشخصی از EF-water (کنترل منفی) تجاری یا استاندارد کالیبره سازنده (۰٫۲۵ و ۰٫۰۵ و ۱ و ۲ λ در EF-water)، کنترل مهاری/افزایشی (۰٫۲۵ و ۰٫۰۵ و ۱ و ۲ λ در نمونه آزمون)یا نمونه آزمون را با دقت در یک لولهٔ آزمون آغشته با واکنشگر LAL برای ارزیابی ژل- توده ریخته و مخلوط کنید. هراندازه‌گیری را برای استاندارد کالیبره و کنترل منفی دو بار و برای کنترل مهاری/افزایشی و نمونه آزمون چهار بار تکرارکنید.

ب-۲-۲ آزمون را همانگونه که دربندهای ب-۷-۲-۱ وب-۷-۲-۳ شرح داده شده انجام دهید.

ب – ۷-۲-۳ آزمون زمانی معتبر است که کنترل منفی (EF-water) و نمونه آزمون منفی هستند و نتیجه استاندارد کالیبره حساسیت درج شده واکنشگر LAL در دامنه بین ۰/۵ تا ۲ λ را تایید می‌کند.

یاد آوری-= در صورتی که نمونه آزمون با اندوتوکسین ها آلوده شده در غلظتی که شامل هیچ اندوتوکسین قابل شناسایی نباشد رقیق می‌شود.

ب-۷-۲- ۴ میانگین هندسی غلظت‌های نقطه پایانی در کنترل مهاری/افزایشی، را همانطور که در بند ب-۷-۱-۵ شرح داده شده است، محاسبه کنید. این میزان میتواند در دامنه بین ۰/۵ تا ۲ λ تایید شود.

ب- ۷-۲-۵ اگر میانگین هندسی غلظت‌های نقطه پایانی در کنترل مهاری/افزایشی خارج از دامنه گفته شده باشد، آزمون را با رقت بالاتری از نمونه آزمایش تکرار کنید. حساسیت قیدشده در برچسب واکنشگر LAL را با ضرب کردن فاکتور رقت تصحیح کنید تا از تداخل جلوگیری شود.

ب ۷-۲-۶ وقتی که نمی‌توان به تداخل با نمونه آزمون با رقیق کردن فائق شد، برای حذف تداخل موارد دیگر مثل صاف کردن، خنثی کردن، دیالیز، یا عملیات حرارتی را به‌کار گیرید.

ب ۷-۲-۲ وقتی که به تداخل با رقیق کردن نمونه آزمون یا سایر موارد قابل پذیرش فائق نشوید آزمون LAL بوسیله روش ژل توده را نمی‌تواند به کار گیرید.

ب-۷-۳ سنجش با نمونه آزمون

ب-۷-۳-۱ یک مقدار تعین شده (مطابق با دستورالعمل های سازنده) EF-water (کنترل منفی), کنترل مهاری/افزایشی (۰٫۲۵ و ۰٫۰۵ و ۱ و ۲ λ در نمونه آزمون)یا نمونه آزمون (غیر رقیق شده, رقت ۲ برابر یا رقت ۴ برابر یا رقت ۸ برابر در EF-water)را با دقت در یک لولهٔ آزمون آغشته با واکنشگر LAL برای ارزیابی ژل- توده ریخته و مخلوط کنید. هراندازه گیری را دوبار تکرارکنید.

ب-۷-۳-۱ آزمون را همانگونه که در بندهای ب ۷-۲-۱ وب-۷-۲-۳ شرح داده شده انجام دهید.

ب-۷-۳-۳ آزمون زمانی معتبر است که شرایط زیر وجود داشته باشد:
الف- تکرارهای کنترل منفی(EF-water)منفی هستند.
ب- تکرارهای کنترل مهاری/افزایشی مثبت هستند
پ- میانگین هندسی غلظت نقطه پایانی استاندارد کالیبره در دامنه بین ۰/۵ تا ۲ λ باشد.

ب-۷-۳ -۴ بالاترین فاکتور رقت که آخرین بازده نتیجه مثبت را دارد به عنوان نقطه پایانی تعریف شده است، غلظت نقطه پایانی را با ضرب کردن نقطه پایانی در حساسیت درج شده یا حساسیت اصلاح شده محاسبه کنید تا غلظت اندوتوکسین در نمونه آزمون غیر رقیق شده بدست آید.

ب-۷-۳-۵ میانگین هندسی غلظت اندوتوکسین را به عنوان غلظت نقطه پایانی در نمونه آزمون گزارش کنید.

ب-۷-۳-۶ اگر هیچ کدام از رقت‌های نمونه آزمون مثبت نباشد غلظت اندوتوکسین در نمونه آزمون را باید کمتر از حساسیت درج شده یا حساسیت تصحیح شده گزارش کنید.

ب-۷-۳ اگر همه رقت‌ها مثبت باشند غلظت اندوتوکسین در نمونه آزمون را باید مساوی یا بیشتر از بالاترین فاکتور غلظت ضرب شده در حساسیت درج شده یا حساسیت تصحیح شده گزارش کنید.

پیوست پ
(اطلاعاتی)
روش نقطه پایانی فتومتریک

۱- پ کلیات

این پیوست مثالی از روش اجرایی نقطه پایانی فتومتریک با استفاده از یک سوبسترای مصنوعی مانند Boc-Leu-Gly-Arg-p-NA یا Boc-Thr-Gly-Arg-p-NA را شرح میدهد.

میزان p-NA در مخلوط واکنش به وسیله چگالی نوری p-NA در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

۲- پ واکنشگرها

۱-۲-پ واکنشگر لیوفیلیزه شده LAL برای روش کروموژنیک با حساسیت λ.

۲-۲-پ بافر کنترل شده[1] برای واکنشگر LAL

۳-۲-پ اندوتوکسین استاندارد کنترل لیوفیلیزه (CSE)

۴-۲-پ آب فاقد اندوتوکسین (EF-Water)

۵-۲-پ محلول متوقف کننده[2] (به دستور سازنده واکنشگر LAL مراجعه کنید.)

یاد آوری- واکنشگرها به صورت کیت از قبل بسته‌بندی شده تجاری در دسترس هستند.

پ – ۳ وسایل

پ-۳-۱ لوله‌های شیشه‌ای یا ظروف میکروتیتر پلی استایرن (میکروپلیت) فاقد اندوتوکسین

پ-۳-۲ ظروف شیشه‌ای یا لوله‌ها و ظروف پلی استایرن فاقد اندوتوکسین با ظرفیت کافی برای درست کردن رقت‌های استاندارد اندوتوکسین یا نمونه آزمون.

1- Reconstitution buffer
2- Stop solution

پ-۳-۳ جای لوله‌ای برای نگهداری یاگرمخانه‌گذاری کردن لوله‌های واکنش

۴-۳-پ انواع پیپت ، پیپتورهای خودکار [1] و پیپتورهای سریالی [2] همراه با سر سمپلر

۵-۳-پ حمام آبی یا گرمخانه خشک با قابلیت نگهداری ^{o}C (۱± ۳۷).

۶-۳-پ همزن نوع ورتکس

۷-۳-پ دستگاه نور خوان (اسپکتروفوتومتر) یا دستگاه ریز صفحه خوان [3]، مناسب برای اندازه‌گیری در طول موج ۴۰۵ نانو متر

۸-۳-پ زمان سنج

یاد آوری – برای آماده سازی وسایل و ظروف آزمایشگاهی فاقد اندوتوکسین به بند ۲-۵-۶ مراجعه کنید.

یاد آوری ۲- محصولات فاقد اندوتوکسین معمولا با عنوان غیرتب‌زا بر چسب‌گذاری می‌شوند.

پ-۴ آماده سازی منحنی استاندارد

پ-۴-۱ آماده سازی محلول استوک

از محلول CSE به شکل پودر لیوفیلیزه استفاده کنید. برای ساختن محلول استوک CSE محتویات ویال CSE را با EF-Water بازسازی کنید.غلظت کاربردی ویال روی گواهی همراه آن درج خواهد شد.

پ-۴-۲ آماده سازی استانداردهای کالیبره

1 -Automatic pipettors
2 - Repeating pipettors
3 - Microplate reader

استاندارد کالیبره را از رقیق کردن CSE باEF-Water آماده کنید. استانداردهای کالیبره باید حداقل متشکل از ۳ غلظت شامل حساسیت قید شده در برچسب(λ) واکنشگر LAL باشد. رقت CSE را در رقت‌های متوالی مطابق با روش‌های سازنده آماده کنید .در هر غلظتی فاکتور رقت CSE نباید بیش از ۱۰ باشد تا خطای ناشی از استفاده از پیپیت کمتر شود.

پ-۵ آماده سازی کنترل مهاری/افزایشی(I/EC)

محلول کنترل مهاری/افزایشی را از رقیق کردن محلول استوک CSE با نمونه آزمون غیر رقیق شده آماده کنید. چندین انتخاب برای غلظت اندوتوکسین در کنترل مهاری/افزایشی وجود دارد(به عنوان مثال λ ۲ و λ ۴ یا غلظت میانی منحنی استاندارد). معمولا غلظت میانی منحنی استاندارد به کار گرفته می‌شود. جهت اجتناب از رقیق شدن زیاد نمونه آزمون مقدار محلول مادر CSE برای محلول افزایشی[۳۵] نباید بیش از ۵٪ شود. (به طور مثال: مقدار محلول CSE برای محلول افزایشی نباید بیش از 50µl در حجم کل ۱ml از محلول I/EC باشد).

پ-۶ روش های اجرایی آزمایشگاهی

پ-۶-۱ واکنشگر لیوفیلیزه شده LAL شامل یک سوبسترای مصنوعی را با آب فاقد اندوتوکسین یا یک بافر مناسب حل کنید تا محلول واکنشگر LAL مطابق با روش‌های سازنده ساخته شود.

پ-۶-۲ حجم مشخصی از واکنشگر LAL سازنده را با یک حجم مشخص از آب فاقد اندوتوکسین (کنترل منفی), استاندارد کالیبره، کنترل مهاری/افزایشی یا نمونه آزمون در یک لوله واکنش یا یک صفحه میکروتیتر مخلوط کنید.

پ-۶-۳ لوله های آزمون یا صفحه میکروتیتر را برای یک دوره زمانی مشخص در دمای ۳۷ (±۱) ^{o}C در داخل گرمخانه مطابق با روش‌های ارائه شده توسط سازنده گرمخانه‌گذاری کنید.

پ-۶-۳ حجم مشخصی از محلول متوقف‌کننده ارائه شده توسط کارخانه (موجود در کیت) را به مخلوط واکنش اضافه کنید و چگالی نوری مخلوط واکنش را در طول موج ۴۰۵ نانومتر به وسیله یک دستگاه نور سنج یا اسپکتروفوتومتر بخوانید.

پ-۶-۴ برای یک سیستم خودکار وسایل و روش آزمون را مطابق با سیستم اصلاح و تغییر دهید.

پ-۷ معیارهای پذیرش آزمون

پ-۷-۱ منحنی استاندارد از ترسیم چگالی نوری خوانده شده در مقابل غلظت برای استانداردهای کالیبره ساخته میشود.

پ-۷-۲ کنترل منفی باید غیرقابل واکنش باشد. (به عبارت دیگر مقدار اندوتوکسین محاسبه شده برای کنترل منفی نباید با نقطه پایینی روی منحنی استاندارد همپوشانی داشته باشد).

پ-۷-۳ برای ساختن منحنی استاندارد یک الگوریتم رگرسیون خطی استفاده میشود.

پ-۷-۴ ضریب همبستگی منحنی استاندارد باید حداقل ۹۸۰/. باشد.اگر منحنی استاندارد معیار های پذیرش را نداشته باشد آزمون را تکرار کنید.

۵-۷-پ دقت (درصد ضریب تغییر)CV% نمونه مورد مطالعه باید در حدود ۲۵٪ باشد.

پ-۸ محاسبه غلظت اندوتوکسین در نمونه آزمون

پ-۸-۱ معیار پذیرش آزمون باید بدست بیاید.

پ-۸-۲ برای خواندن غلظت اندوتوکسین میانگین حسابی چگالی نوری هر سطح آزمون باید با منحنی استاندارد تطبیق داده شود.

پ-۸-۳ غلظت اندوتوکسین هر سطح آزمون را در فاکتور رقت متناظر ضرب کنید تا غلظت اندوتوکسین نمونه آزمون غیر رقیق شده بدست آید.

پ-۸-۴ غلظت‌های اندوتوکسین را به صورت حسابی میانگین گرفته و میانگین را به عنوان غلظت اندوتوکسین نمونه آزمون غیر رقیق شده در نظر بگیرید.

پ- ۹ صحه گذاری روش آزمون

پ-۹-۱ بازیابی اندوتوکسین در کنترل مهاری/افزایشی باید با تقسیم غلظت اندوتوکسین مشاهده شده در نمونه آزمون به غلظت اندوتوکسین اسمی محاسبه می شود.عدد بازیابی به درصد بیان میشود.

پ-۹-۲ بازیابی غلظت اندوتوکسین اضافه شده در کنترل مهاری/افزایشی باید بین ۵۰٪ تا ۲۰۰٪ مقدار اسمی باشد.اگر بازیابی غلظت اندوتوکسین اضافه شده خارج از محدوده ذکر شده باشد، نمونه موردمطالعه با آزمون تداخل میکند. در صورت شناسایی تداخل، آزمون را با استفاده از یک نمونه آزمون بدون تداخل معنی دار تکرار کنید. رقیق سازی یا موارد دیگر مثل صاف کردن خنثی کردن، دیالیز یا عملیات حرارتی ممکن است تداخل را حذف کند. بنابراین، کنترل مهاری/افزایشی رابا استفاده از نمونه آزمون بدون تداخل آماده کنید.

پیوست ت

(اطلاعاتی)

روش سینتیک

ت-۱ کلیات

این پیوست مثالی از روش اجرایی برای روش‌های سینتیک با استفاده از تکنیک‌های کدورت سنجی یا رنگ زایی به وسیله یک دستگاه ریز صفحه خوان[1] را شرح میدهد.

ت- ۲ واکنشگرها

ت-۲-۱ واکنشگر لیوفیلیزه LAL برای روش رنگ‌زایی یا کدورت سنجی با حساسیت λ.

ت-۲-۲ آب فاقد اندوتوکسین یا بافر حل شده برای واکنشگر LAL

ت-۲-۳ آب فاقد اندوتوکسین

ت-۲-۴ اندوتوکسین استاندارد کنترل لیوفیلیزه

یاد آوری – واکنشگر ها به صورت کیت از قبل بسته‌بندی شده تجاری دسترس هستند.

ت-۳ وسایل

ت-۳-۱ لوله‌های شیشه‌ای یا ظروف میکروتیتر پلی استایرن (میکروپلیت) فاقد اندوتوکسین

ت-۳-۲ ظروف شیشه‌ای یا لوله‌ها و ظرف پلی استایرن فاقد اندوتوکسین با ظرفیت کافی برای درست کردن رقت‌های استاندارد اندوتوکسین یا نمونه آزمون.

ت-۳-۳ انواع پیپت و پیپتورهای خودکار، پیپتورهای سریالی با سر سمپلر

1-Incubating optical reader or microplate reader

ت-۳- ۴ دستگاه ریز صفحه خوان

یادآوری۱- برای آماده سازی وسایل و ظروف آزمایشگاهی فاقد اندوتوکسین به بند ۶-۵-۲ مراجعه کنید.

یاد آوری - محصولات فاقد اندوتوکسین معمولا با عنوان غیر تب‌زا بر چسب گذاری می‌شوند.

ت-۴ آماده‌سازی منحنی استاندارد

ت-۴-۱ آماده سازی محلول مادر

از محلول CSE به شکل پودر لیوفیلیزه استفاده کنید. برای ساختن محلول مادر CSE محتویات ویال CSE را با EF-Water بازسازی کنید. غلظت کاربردی ویال روی گواهی همراه آن درج خواهد شد.

ت-۴- ۲ آماده سازی استاندارد های کالیبره

استاندارد کالیبره را از رقیق کردن CSE با EF-water آماده کنید.استانداردهای کالیبره باید حداقل متشکل از ۳ غلظت شامل حساسیت قید شده در برچسب (λ) واکنشگر LAL باشد. رقت CSE را در رقتهای متوالی مطابق با روش‌های سازنده آماده کنید .در هر غلظتی فاکتور رقت CSE نباید بیش از ۱۰ باشد تا خطای ناشی از استفاده از پیپیت کمتر شود.

۵-ت آماده سازی کنترل مهاری/افزایشی

محلول کنترل مهاری/افزایشی را از رقیق کردن محلول مادر CSE با نمونه آزمون غیر رقیق شده آماده کنید. چندین انتخاب برای غلظت اندوتوکسین در کنترل مهاری/افزایشی وجود دارد(به عنوان مثال λ ۲ و λ ۴ یا غلظت میانی منحنی استاندارد). معمولا غلظت میانی منحنی استاندارد به کار گرفته میشود.

جهت اجتناب از رقیق شدن زیاد نمونه آزمون مقدار محلول مادر CSE برای محلول افزایشی نباید بیش از ۵٪ شود.(به طور مثال: مقدار محلول CSE برای محلول افزایشی نباید بیش از 50µl در حجم کل ۱ ml از محلول I/EC باشد.)

ت-۶ روش‌های اجرایی آزمایشگاهی

ت-۶-۱ واکنشگر لیوفیلیزه شده LAL را با EF-water یا یک بافر مناسب حل کنید تا محلول واکنشگر LAL مطابق با دستورات سازنده ساخته شود.

ت-۶-۲ حجم مشخصی از واکنشگر LAL سازنده را با یک حجم مشخص از آب فاقد اندوتوکسین (کنترل منفی)، استاندارد کالیبره، کنترل مهاری/افزایشی یا نمونه آزمون در یک لوله واکنش یا یک صفحه میکروتیتر مخلوط کنید.

ت-۶-۳ لوله آزمون یا صفحه میکروتیتر را به ترتیب در یک Incubating optical reader or microplate reader قرار داده و در دمای (۱±۳۷) نگهداری کنید.

ت-۶-۴ چگالی نوری مخلوط واکنش باید در طول موج مشخص برای سیستم آزمون به کار رفته و در فواصل معین اندازه‌گیری شود.

ت-۶-۵ زمان لازم برای رسیدن به چگالی نوری از پیش تعیین شده مخلوط واکنش را مشخص کنید. (۲./. واحدچگالی نوری یا واحد چگالی نوری مشخص شده توسط سازنده). زمان لازم برای رسیدن به چگالی نوری از پیش تعیین شده زمان شروع نامیده می‌شود.

یاد آوری- سیستم‌های آزمون خودکار اختصاص یافته برای این روش اجرایی به صورت تجاری در دسترس هستند.

ت-۷ معیار قابل پذیرش آزمون

ت-۷-۱ منحنی استاندارد را با ترسیم زمان شروع در مقابل غلظت استانداردهای کالیبره بعد از انتقال داده‌ها به یک فرمول مشخص(به عنوان مثال:Log_{10}) مطابق با یک الگوریتم رگرسیون توصیه شده توسط سازنده تهیه کنید.

ت-۷-۲ کنترل منفی باید غیرقابل واکنش باشد. (به عبارت دیگر مقدار اندوتوکسین محاسبه شده برای کنترل منفی نباید با نقطه پایینی روی منحنی استاندارد همپوشانی داشته باشد).

ت-۷-۳ ضریب همبستگی منحنی استاندارد باید حداقل۹۸۰ ۰/۰باشد. اگر منحنی استاندارد معیارهای پذیرش را نداشته باشد آزمون را تکرار کنید.

ت-۷-۴ دقت (درصد ضریب تغییر% CV) نمونه مورد مطالعه باید ۲۵٪ باشد.

۸-ت محاسبه غلظت اندوتوکسین در نمونه آزمون

ت-۸-۱ معیار پذیرش آزمون باید بدست بیاید.

ت-۸-۲ برای خواندن غلظت اندوتوکسین میانگین حسابی چگالی نوری هر سطح آزمون را با منحنی استاندارد تطبیق دهید.

ت-۸-۳ غلظت اندوتوکسین هر سطح آزمون را در فاکتور رقت متناظر ضرب کنید تا غلظت اندوتوکسین نمونه آزمون غیر رقیق شده بدست آید.

ت-۸- ۴غلظ‌های اندوتوکسین را به صورت حسابی میانگین گرفته و میانگین را به عنوان غلظت اندوتوکسین نمونه آزمون غیر رقیق شده در نظر بگیرید.

ت-۹ صحه گذاری روش آزمون

ت-۹-۱ بازیابی اندوتوکسین در کنترل مهاری/افزایشی را با تقسیم غلظت اندوتوکسین مشاهده شده در نمونه آزمون به غلظت اندوتوکسین اسمی محاسبه کنید. عدد بازیابی به درصد بیان می‌شود.

ت-۸-۱ بازیابی غلظت اندوتوکسین اضافه شده در کنترل مهاری/افزایشی باید بین ۵۰٪ تا ۲۰۰٪ مقدار اسمی باشد. اگر بازیابی غلظت اندوتوکسین اضافه شده خارج از محدوده ذکر شده باشد، نمونه موردمطالعه با آزمون تداخل میکند.

در صورت شناسایی تداخل، آزمون را با استفاده از یک نمونه آزمون بدون تداخل معنی دار تکرار کنید. رقیق سازی یا موارد دیگر مثل صاف کردن، خنثی کردن، دیالیز یا عملیات حرارتی ممکن است تداخل را حذف کند. بنابراین، کنترل مهاری/افزایشی رابا استفاده از نمونه آزمون بدون تداخل آماده کنید.

پیوست ث

(اطلاعاتی)

کتابشناسی

1-ISO 10993-12:2007, Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials

2-ISO 14644-1, Cleanrooms and associated controlled environments — Part 1: Classification of air cleanliness

3-ISO 14644-2, Cleanrooms and associated controlled environments — Part 2: Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO 14644-1

4-ISO 14644-7, Cleanrooms and associated controlled environments — Part 7: Separative devices (clean air hoods, gloveboxes, isolators and mini-environments)

5-ISO/TS 80004-13), Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms

6-Nanotechnology Characterization Lab., National Cancer Institute. NCL Method STE-1 Version 1.0 Detection of Endotoxin Contamination by End Point Chromogenic LAL Assay. 2005

7-TAKAGI, T. et al. S. Amino acid sequence of Japanese horseshoe crab Tachypleus tridentatus coagulogen B Chain: Completion of the coagulogen sequence 12. The Journal of Biochemistry (Tokyo), 95, 1984, pp. 1445 -1457

8-POOLE, S. et al. Second international standard for endotoxin: calibration in an international collaborative study. Journal of Endotoxin Research, 4, 1997, pp. 221-231
9-SPAAN, S. et al. Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin. Appl. Environ Microbiol., 74, 2008, 3804-3811
10-ESCH, R.K. et al. Endotoxin contamination of engineered (nanomaterials. Nanotoxicology, 2010
11-US FDA, Inspection Technical Guide (ITG) No.40 dated 3/20/85. For a discussion of Bacterial endotoxins/pyrogens
12-IWANAGA, S. The Limulus clotting reaction. Current Opinion in Immunology, 5, 1993, pp. 74 - 82
13-VALLHOV, H. et al. The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. Nano Letters, 6, 2006, pp. 1682-1686
14-ZHONG, W.W. et al. Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. Archives of Surgery, 28, 1993, pp.158-63; discussion, pp. 163-164
15-COOPERSTOCK, M.S. Inactivation of endotoxin by polymyxin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 6, 1974, pp. 422-425
16-CARDOSO, L.S. et al. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of Schistosoma mansoni recombinant proteins in human cytokine analysis. Microbial Cell Factories, 6, 2007, pp. 1 - 6
17-BOHRER, D. et al. Interference in the Limulus amebocyte lysate assay for endotoxin determination in
peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical

Analysis, 26, 2001, pp. 811-818
.3)To be published

18-SULLIVAN, J.D. and WATSON, S.W. Inhibitory effect of heparin on the Limulus test for endotoxin. Journal of Clinical Microbiology, 2, 1975, p. 151

19-HOSOBUCHI, K. et al. Recovery of Bacterial Endotoxin from Medical Devices. Bulletin of Tokyo Metropolitan Industrial Technology (Research Institute. 2007. No. 1. (In Japanese)

20-TSUCHIYA, M. Current status of the application of Limulus test. Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, 18, 1990, pp. 281-291 (In Japanese)

21-NOVITSKY, T.J. et al. Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces. Journal of arenter Science and Technology, 40, 1986, pp. 284 – 286

22-DARKOW, R. et al. Functionalized nanoparticlesBiomaterials, 20, .1999, pp. 1277-1283for endotoxin binding in aqueous solutions

23-DOUWES, J. et al. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1995, pp. 1763-1769

24-ROTH, R.I. and LEVIN, J. Purification of Limulus polyphemus pp. 24097-24102 ,۱۹۹۲proclotting enzyme. J. Biol. Chem., 267

25-SPAAN, S. et al. Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin. Appl. Environ Microbiol., 74, 2008, pp. 3804-3811

26-European Pharmacopoeia

27-Japanese Pharmacopoeia

28-United States Pharmacopoeia