فصلنامه پژوهش در علوم، مهندسی و فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۲۷-۴۳
ISSN: 2476-5082
www.uctjournals.com

کاربرد های تست lal

پریسا بیگدلی۱ ، عزت نوری زاده۲*
۱ کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل؛ ایران
۲ استادیار دانشگاه محقق اردبیلی دانشکده علوم گروه زیست شناسی، اردبیل
*محل انجام پروژه :دانشگاه محقق اردبیلی و کارخانه داروسازی ارتا سرم اردبیل
منبع حمایت کننده طرح: دانشگاه محقق اردبیلی و کارخانه آرتا سرم اردبیل

مقاله مروری

تست LAL

اساس این روش بر واکنش تشکیل ژلی استوار است که در اثر مجاورت معرف LAL با مقادیر بسیار کم آندوتوکسین‌های باکتریایی (در حد پیکوگرم) انجام می‌شود. معرف LAL شامل آمیبوسیت‌های لیز شده خون یک نوع خرچنگ نعل اسبی (Horse Shoe Crab) با نام علمی Limulus PolypHemus می‌باشد. سختی ژل حاصله نسبت مستقیمی با حساسیت لایست (Lysate sensitivity) و میزان آندوتوکسین موجود در محیط دارد و دقت این روش به حدی است که در تعیین مقدار آندوتوکسین‌ها به روش کدورت سنجی نیز قابل استفاده می‌باشد . خرچنگ نعل اسبی Limulus PolypHemus متعلق به شاخه Arthropod SubpHylum Chelicerata که به وفور در آب‌های اقیانوس اطلس در سواحل آمریکا یافت می‌شود. در حالت بلوغ ظاهری مانند یک حیوان کروستاسه (خرچنگی) که به رنگ سبز زیتونی بوده و چهره شکمی با یک زائده دمی دارد که اندازه‌اش در حدود ۶۰ سانتی‌متر بوده و وزن آن‌گاه به چند کیلوگرم می‌رسد. Limulus PolypHemus در واقع یک حیوان کروستاسه نمی‌باشد بلکه یک بندپا مثل عقرب یا عنکبوت می‌باشد و تشکیل یک شاخه فسیلی می‌دهد. (۱)

شکل ۱- خرچنگ نعل اسبی Limulus polypHemus

همولنف در حال گردش در عروق این خرچنگ، پیگمانته بوده و حاوی عناصری به شکل ماکروفاژ انسانی به نام آمیبوسیت یا هموسیت می‌باشد. این سلول‌های در حال گردش که مملو از گرانول‌های متراکم هستند دارای عمل فاگوسیتوز بوده و قابل آگلوتیناسیون، آگرگاسیون و دگرانولاسیون می‌باشند که منجربه کوآگولاسیون می‌گردد و این همان پدیده‌ایست که Bang و Levin در سال ۱۹۶۰ به آن اشاره نمودند. این پدیده در حضور مقادیر بسیار کم آندوتوکسین‌های باکتری‌های گرم منفی، به وسیله فعال کننده‌های آنزیماتیک از نوع پروتئاز رخ می‌دهد. سلول‌های خونی ما انسان‌ها حاوی هموگلوبین است که بواسطه برقراری پیوند با آهن، قرمز رنگ است. حال آن‌که خرچنگ نعل اسبی، بجای هموگلبین، هموسیانین دارد که به‌دلیل حضور مس به رنگ آبی دیده می‌شود. (۴)

J.Levin و F. B. Bang نخستین پایه‌گذاران تست LAL، هنگامی که بر روی مکانیسم انعقاد خون ماهی، خرچنگ‌های دراز و خرچنگ‌های گرد مطالعه می‌نمودند به تعدادی خرچنگ نعل اسبی مرده برخورد کرده و پس از اتوپسی متوجه شدند که خون آن‌ها منعقد شده است آن‌ها با تهیه کشت این خون منعقد شده دریافتند که آلوده به اشریشیاکلی و سودوموناس بوده است. این دو دانشمند در مورد ارتباط بین میکروارگانیسم‌ها و پدیده انعقادی مذکور مطالعه نمودند و به دنبال آن اقدام به تزریق میکروارگانیسم‌های گرم منفی به خرچنگ‌های سالم نمودند که نتیجه این کار انعقاد خون و مرگ نسبتا فوری خرچنگ‌ها بود. دانشمندان مذکور به‌منظور مطالعه دقیق‌تر اقدام به گرفتن خون این خرچنگ‌ها نمودند و برای جلوگیری از لخته شدن آن،

پس از آزمایش مواد ضد انعقادی مانند N-Ethyl-Malamide که هنوز هم یه ضد انعقاد موثر در این زمینه می‌باشد استفاده کردند. انجام تحقیقات بعدی این دو دانشمند منجربه جداسازی و استخراج آمیبوسیت‌های خون این خرچنگ گردید .
مطالعات بیوشیمیای انجام شده روشن نموده است که جهت تشکیل ژل علاوه بر آندوتوکسین‌ها و آمیبوسیت‌های لیز شده، حضور سه فاکتور دیگر نیز ضروری می‌باشد که این فاکتورها عبارتند از:

- آنزیم پیشتاز تشکیل لخته Pro clotting Enzyme
- پروتئین قابل انعقاد Coagulogen
- کاتیون‌های دو ظرفیتی مخصوص

یک معرف LAL پس از حل شدن حاوی سه فاکتور مذکور می‌باشد. امروزه در ژاپن با استفاده از نمونه دیگری از این خرچنگ با نام علمی Tachypleus tridentatus نیز معرف LAL ساخته می‌شود.
تست LAL در مقام مقایسه بسیار حساس تر دقیق‌تر از تست خرگوش می‌باشد. مزایای این تست را می‌توان بدین صورت برشمرد :

- با توجه به سرعت قابل ملاحضه‌ای که تست LAL از آن برخوردار می‌باشد، امکان تکرار تست به دفعات بر روی یک نمونه و در نتیجه حصول اطمینان از درستی نتایج به‌دست آمده وجود دارد. (۷)

این تست در مقایسه با روش invivo خرگوش به‌دلیل عدم وجود متغیرهای فیزیولوژیی حیوان زنده، نتایج مطمئن‌تری به‌دست خواهد داد، و برخلاف تست خرگوش، تعیین محدوده دقیق "قبول یا رد" جواب‌ها در مورد تست LAL امکان‌پذیر می‌باشد.
با توجه به حساسیت بالایی که معرف LAL نسبت به آندوتوکسین باکتریای (در حد پیکوگرم) دارد. این روش در مقایسه با خرگوش ۱۰ تا ۲۰ بار حساس‌تر می‌باشد.
یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های تست LAL اثر مهاری برخی از مواد بر روی روند واکنش تشکیل ژل می‌باشد. آنتی بیوتیک‌ها و محلول‌های حاوی الکترولیت و برخی از کورتیکوستروئیدها از مهم‌ترین این مواد هستند.
Y.de Jong و J.Van Noordwijk در مطالعات خود مشخص نمودند که تتراسایکلین هیدروکلراید و اکسی تتراسایکلین در حضور ۵ نانوگرم از آندوتوکسین اشریشیاکلی (۲۵ واحد آندوتوکسین) قادر به مهار تشکیل ژل بین معرف LAL و آندوتوکسین می‌باشد و تنها زمانی این اثر مهاری برطرف می‌گردد که غلظت آنتی بیوتیک‌های نام برده در محیط تا حد ۰/۶۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر از محلول کاهش یابد و این در حالی است که محدوده آغاز واکنش تشکیل ژل بین ۵۰ تا ۱۰۰ پیکوگرم (۰/۲۵ تا ۰/۵ واحد آندوتوکسین) می‌باشد. هم‌چنین پنی سیلین‌های با غلظت بالاتر از ۰/۵ ٪ نیز چنین اثری را اعمال می‌کند.
اثر مهاری ناشی از محلول‌های تزریقی حاوی الکترولیت در این زمینه از اهمیت بیشتری برخوردار است. یون کلسیم با غلظتی معادل ۰/۳۴ مولار قادر به مهار واکنش LAL می‌باشد. (۹)
چنانچه در هنگام تهیه و یا استخراج مواد مورد آزمایش، دقت کافی مبذول نگردد تا احتمال حضور حتی مقادیر ناچیز از آندوتوکسین (در حد پیکوگرم در میلی‌لیتر) از بین برود، امکان پاسخ مثبت در تست LAL وجود دارد. هم‌چنین آبی که عاری از پیروژن بودن آن به‌دلیل عدم انجام تست‌های کنترل پیروژن مسلم نشده و یا ابزار و ظروف به خوبی عاری از پیروژن نگردیده باشند، می‌توانند منشاء بروز پاسخ مثبت در واکنش LAL باشند، از این رو هر گونه ادعایی مبنی بر غیر اختصاصی بودن این تست باید دقیقا مورد بررسی قرار گیرد. بیشترین احتمال بروز جواب‌های منفی کاذب در تست LAL مربوط به محلول‌های حاوی الکترولیت می‌باشد مورد دیگر احتمال بروز منفی کاذب، مربوط به مهارکننده‌های آنزیمی و مواد دناتوره-کننده پروتئین‌ها می‌باشد .

تستLAL

اساس این روش بر واکنش تشکیل ژلی استوار است که در اثر مجاورت معرف LAL با مقادیر بسیار کم آندوتوکسین‌های باکتریایی (در حد پیکوگرم) انجام می‌شود. معرف LAL شامل آمیبوسیت‌های لیز شده خون یک نوع خرچنگ نعل اسبی (Horse Shoe Crab) با نام علمی Limulus PolypHemus می‌باشد. سختی ژل حاصله نسبت مستقیمی با حساسیت

لایست(Lysate sensitivity) و میزان آندوتوکسین موجود در محیط دارد و دقت این روش به حدی است که در تعیین مقدار آندوتوکسین‌ها به روش کدورت سنجی نیز قابل استفاده می‌باشد . خرچنگ نعل اسبی Limulus PolypHemus متعلق به شاخه Arthropod SubpHylum Chelicerata که به وفور در آب‌های اقیانوس اطلس در سواحل آمریکا یافت می‌شود. در حالت بلوغ ظاهری مانند یک حیوان کروستاسه (خرچنگی) که به رنگ سبز زیتونی بوده و چهره شکمی با یک زائده دمی دارد که اندازه‌اش در حدود ۶۰ سانتی‌متر بوده و وزن آن‌گاه به چند کیلوگرم می‌رسد. Limulus PolypHemus در واقع یک حیوان کروستاسه نمی‌باشد بلکه یک بندپا مثل عقرب یا عنکبوت می‌باشد و تشکیل یک شاخه فسیلی می‌دهد . (۶)

همولنف در حال گردش در عروق این خرچنگ، پیگمانته بوده و حاوی عناصری به شکل ماکروفاژ انسانی به نام آمیبوسیت یا هموسیت می‌باشد. این سلول‌های در حال گردش که مملو از گرانول‌های متراکم هستند دارای عمل فاگوسیتوز بوده و قابل آگلوتیناسیون، آگرگاسیون و دگرانولاسیون می‌باشند که منجربه کوآگولاسیون می‌گردد و این همان پدیده‌ایست که Bang و Levinدر سال ۱۹۶۰ به آن اشاره نمودند. این پدیده در حضور مقادیر بسیار کم آندوتوکسین‌های باکتری‌های گرم منفی، به وسیله فعال کننده‌های آنزیماتیک از نوع پروتئاز رخ می‌دهد. سلول‌های خونی ما انسان‌ها حاوی هموگلوبین است که بواسطه برقراری پیوند با آهن، قرمز رنگ است. حال آن‌که خرچنگ نعل اسبی، بجای هموگلبین، هموسیانین دارد که به‌دلیل حضور مس به رنگ آبی دیده می‌شود . (۱۱)

J.Levin و F. B. Bang نخستین پایه‌گذاران تستLAL ، هنگامی که بر روی مکانیسم انعقاد خون ماهی، خرچنگ‌های دراز و خرچنگ‌های گرد مطالعه می‌نمودند به تعدادی خرچنگ نعل اسبی مرده برخورد کرده و پس از اتوپسی متوجه شدند که خون آن‌ها منعقد شده است آن‌ها با تهیه کشت این خون منعقد شده دریافتند که آلوده به اشریشیاکلی و سودوموناس بوده است. این دو دانشمند در مورد ارتباط بین میکروارگانیسم‌ها و پدیده انعقادی مذکور مطالعه نمودند و به دنبال آن اقدام به تزریق میکروارگانیسم‌های گرم منفی به خرچنگ‌های سالم نمودند که نتیجه این کار انعقاد خون و مرگ نسبتا فوری خرچنگ‌ها بود. دانشمندان مذکور به‌منظور مطالعه دقیق‌تر اقدام به گرفتن خون این خرچنگ‌ها نمودند و برای جلوگیری از لخته شدن آن، پس از آزمایش مواد ضد انعقادی مانند N-Ethyl-Malamide که هنوز هم یه ضد انعقاد موثر در این زمینه می‌باشد استفاده کردند. انجام تحقیقات بعدی این دو دانشمند منجربه جداسازی و استخراج آمیبوسیت‌های خون این خرچنگ گردید .

مطالعات بیوشیمیای انجام شده روشن نموده است که جهت تشکیل ژل علاوه بر آندوتوکسین‌ها و آمیبوسیت‌های لیز شده، حضور سه فاکتور دیگر نیز ضروری می‌باشد که این فاکتورها عبارتند از:

- آنزیم پیشتاز تشکیل لختهPro clotting Enzyme
- پروتئین قابل انعقادCoagulogen
- کاتیون‌های دو ظرفیتی مخصوص (۱۴)

یک معرف LAL پس از حل شدن حاوی سه فاکتور مذکور می‌باشد. امروزه در ژاپن با استفاده از نمونه دیگری از این خرچنگ با نام علمی Tachypleus tridentatus نیز معرف LAL ساخته می‌شود.

تست LAL در مقام مقایسه بسیار حساس تر دقیق‌تر از تست خرگوش می‌باشد. مزایای این تست را می‌توان بدین صورت برشمرد:

با توجه به سرعت قابل ملاحضه‌ای که تست LAL از آن برخوردار می‌باشد، امکان تکرار تست به دفعات بر روی یک نمونه و در نتیجه حصول اطمینان از درستی نتایج به‌دست آمده وجود دارد. این تست در مقایسه با روش invivo خرگوش به‌دلیل عدم وجود متغیرهای فیزیولوژیی حیوان زنده، نتایج مطمئن‌تری به‌دست خواهد داد، و برخلاف تست خرگوش، تعیین محدوده دقیق "قبول یا رد" جواب‌ها در مورد تست LAL امکان‌پذیر می‌باشد. با توجه به حساسیت بالایی که معرف LAL نسبت به آندوتوکسین باکتریای (در حد پیکوگرم) دارد. این روش در مقایسه با خرگوش ۱۰ تا ۲۰ بار حساس‌تر می‌باشد.

یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های تست LAL اثر مهاری برخی از مواد بر روی روند واکنش تشکیل ژل می‌باشد. آنتی بیوتیک‌ها و محلول‌های حاوی الکترولیت و برخی از کورتیکوستروئیدها از مهم‌ترین این مواد هستند. (۲)

Y.de Jongو J.Van Noordwijk در مطالعات خود مشخص نمودند که تتراسایکلین هیدروکلراید و اکسی تتراسایکلین در حضور ۵ نانوگرم از آندوتوکسین اشریشیاکلی (۲۵ واحد آندوتوکسین) قادر به مهار تشکیل ژل بین معرف LAL و آندوتوکسین می‌باشد و تنها زمانی این اثر مهاری برطرف می‌گردد که غلظت آنتی بیوتیک‌های نام برده در محیط تا حد ۰/۶۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر از محلول کاهش یابد و این در حالی است که محدوده آغاز واکنش تشکیل ژل بین ۵۰ تا ۱۰۰ پیکوگرم (۰/۲۵ تا ۰/۵ واحد آندوتوکسین) می‌باشد. هم‌چنین پنی سیلین‌های با غلظت بالاتر از ۰/۵ ٪ نیز چنین اثری را اعمال می‌کند.

اثر مهاری ناشی از محلول‌های تزریقی حاوی الکترولیت در این زمینه از اهمیت بیشتری برخوردار است. یون کلسیم با غلظتی معادل ۰/۳۴ مولار قادر به مهار واکنش LAL می‌باشد.

چنانچه در هنگام تهیه و یا استخراج مواد مورد آزمایش، دقت کافی مبذول نگردد تا احتمال حضور حتی مقادیر ناچیز از آندوتوکسین (در حد پیکوگرم در میلی‌لیتر) از بین برود، امکان پاسخ مثبت در تست LAL وجود دارد. هم‌چنین آبی که عاری از پیروژن بودن آن به‌دلیل عدم انجام تست‌های کنترل پیروژن مسلم نشده و یا ابزار و ظروف به خوبی عاری از پیروژن نگردیده باشند، می‌توانند منشاء بروز پاسخ مثبت در واکنش LAL باشند، از این رو هر گونه ادعایی مبنی بر غیر اختصاصی بودن این تست باید دقیقا مورد بررسی قرار گیرد.

بیشترین احتمال بروز جواب‌های منفی کاذب در تست LAL مربوط به محلول‌های حاوی الکترولیت می‌باشد مورد دیگر احتمال بروز منفی کاذب، مربوط به مهارکننده‌های آنزیمی و مواد دناتوره‌کننده پروتئین‌ها می‌باشد. (۳)

اصول روشLAL

همانطور که گفته شد، اولین اصل روشLAL ، کواگولاسیون همولنف خرچنگ نعل اسبی است که ناشی از زنجیره ای واکنش های شیمیایی است که در نهایت موجب ایجاد لخته میشوند. برای فعال سازی این زنجیره واکنش ها بایستی سرین پروتئاز هایی که در همولنف به صورت پروآنزیم هستند فعال شوند تا بتوانند زنجیره کواگولاسیون را فعال کنند. نکته جالب توجه اینجاست که این سرین پروتئازها با حضور کمترین میزان از لیپوپلی ساکارید (LPS) باکتریایی فعال میشوند. نکته جالب اینجاست که میزان LPS ای که میتواند سرین پروتئازهای خرچنگ را فعال کند در حد پیکوگرم است.

به علت اینکه بخش زیادی از اجزای زنجیره کواگولاسیون به واسطه گرانول های ریزی در همولنف خرچنگ به نام amebocytesانجام میشود، به همین دلیل این روش به روش Limulus Amebocyte Lysate نام گذاری شده است. در روش LAL فرایند ایجاد ژل به عنوان یک سیگنال برای حضور اندوتوکسین در نمونه است و این روش به دو صورت کمی و کیفی قابل انجام است. لازم به ذکر است، بر خلاف بسیاری از روش های آزمایشگاهی که موجود آزمایشگاهی پس از آزمایش آسیب دیده یا از بین خواهد رفت، در روش LAL و در فرایند استخراج همولنف خرچنگ اسب آبی، خرچنگ آسیبی ندیده و بخشی از همولنف خرچنگ استخراج شده و خرچنگ به محل زندگی خود انتقال داده خواهد شد. (۹)

مکانیسم روش سنجش اندوتوکسین باLAL

همانطور که گفته شد، رویدادی که در همولنف خرچنگ نعل اسبی رخ میدهد، حاصل فعال شدن چرخه پروتئازی است که در نهایت منجر به ایجاد لخته میشود. LPS پروآنزیم فاکتور C را به صورت اتوکاتالیک فعال کرده و آن را به فاکتور C فعال تبدیل میکند. فاکتورC ، فاکتور B را فعال میکند و فاکتورB ، پروآنزیم ایجاد کننده ژل یا لخته را به آنزیم فعال تبدیل میکند. فاکتور لخته کننده دو جزء محلول لخته را به یکدیگر متصل میکند و به این ترتیب یک جزء نامحلول ایجاد کرده که حاصل آن تشکیل حالت ژل خواهد شد. ترکیب ایجاد شده از نظر ساختاری شباهت زیادی به فیبرینوژن در خانواده بند پایان است.

زنجیره کواگولاسیون علاوه بر فرایند گفته شده با β-D-glucan و از طریق فعال شدن فاکتور G که آن هم یک سرین پروتئاز است هم میتواند موجب ایجاد ژل شود. به همین دلیل β-D-glucan یکی از عوامل مداخله کننده در فرایند تست LAL بوده و به همین دلیل در هنگام انجام تست بایستی از ترکیبات مهار کننده β-D-glucan نیز بایستی استفاده شود.

تست LAL در ابتدا یک تست کاملا کیفی بود و صرفا وجود یا عدم وجود اندوتوکسین به واسطه این تست بررسی میشد اما با توسعه روند انجام تست LAL امروزه این تست به یک تست کاملا کمی تبدیل شده و با استفاده از کیت های LAL میزان دقیق اندوتوکسین به صورت دقیق مشخص میشود. (۱۰)

انواع تستLAL :

همانطور که گفته شد روش LAL سنتی روشی کیفی بوده و به جهت کمی سازی تست تغییراتی در تست اصلی داده شده تا بتوانیم نتایجی دقیق از میزان اندوتوکسین موجود در نمونه به دست بیاوریم.

سه روش اصلی سنجش اندوتوکسین که بر مبنای روش LAL توسعه یافته اند عبارتند از:

- روش ژل کلات(Chromogenic method)
- روش کروموژنیک(Chromogenic method)
- روش کدورت سنجی(Turbidimetric method)

سنجش اندوتوکسین به روش ژل کلات(Gel-clot method)

روش gel-clot یکی از ساده ترین انواع روش های تست LAL و در واقع همان روش سنتی ایجاد لخته است و میتواند حضور یا عدم حضور اندوتوکسین را در نمونه مشخص کند. همانطور که گفته شده در روش سنتی وقتی اندوتوکسین با LAL مواجه میشود بر اثر فعالیت زنجیره آنزیمی پروتئازی amoebocyte coagulogen موجود در LAL تبدیل به لخته یا ژل میشود. در کیت های تجاری مبتنی بر Gel-Clot تغییر ویژه ای در روش انجام تست داده نشده و تنها با ایجاد رقت سریالی از ماده مورد آزمایش و بررسی ایجاد لخته در زمان مشخص شده در پروتکل کیت، حدود میزان اندوتوکسین موجود در نمونه مشخص میشود. (۱۶)

روش gel-clot به نظر حساس ترین و دقیق ترین نوع تست LAL بوده و کمترین میزان مثبت کاذب نسبت به سایر روش ها در این روش مشاهده شده است. همچنین این روش در فارماکوپه آمریکا، اروپا و ژاپن به عنوان روش استاندارد برای تعیین وجود اندوتوکسین در نمونه دارویی معرفی گردیده است. با این وجود این روش زمان بر بوده و قابلیت انجام اتوماتیک ندارد به همین دلیل در حجم های بالای نمونه و امکان ایجاد خطای انسانی این روش توصیه نمیشود.

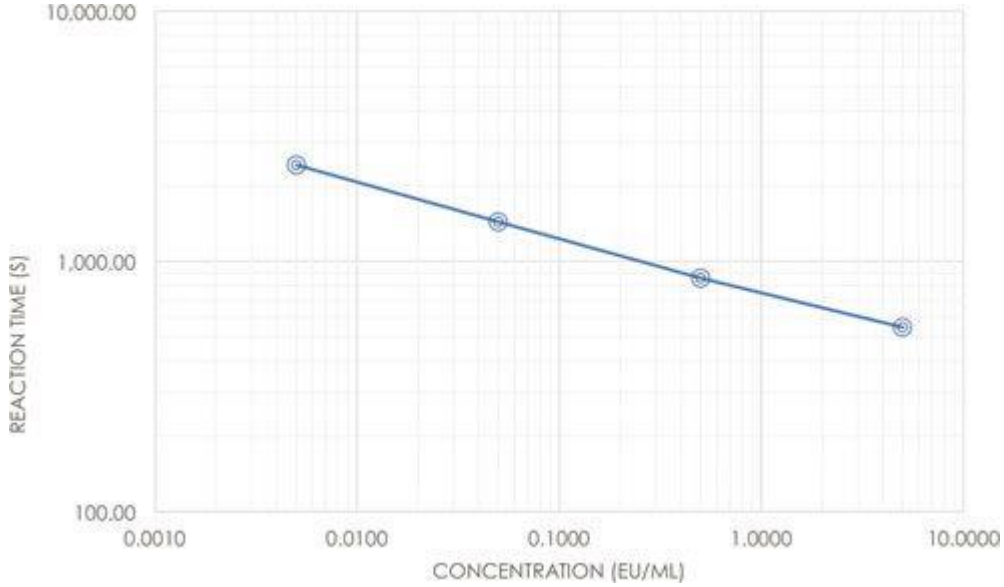
سنجش اندوتوکسین به روش کروموژنیک: (Chromogenic method)

روش کروموژنیک برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ معرفی شد. در این روش سوبسترای رنگ زا (کروموژن) ای با توالی آمینو اسیدی مشابه محل برش کواگلوژن به محیط واکنش اضافه میشود. LAL فعال شده توسط اندوتوکسین این توالی آمینو اسیدی را برش داده و باعث میشود که کروموفور pNA (p-nitroanilide) آزاد شده و در محیط رنگ زرد ایجاد شود.

مولکول pNA در طول موج مشخصی جذب کرده و در روش کروموژنیک میزان جذب نوری را در این طول موج اندازه گیری میکنند. میزان جذب نوری به صورت مستقیم مشخص کننده میزان اندوتوکسین موجود در نمونه است. میزان جذب میتواند به صورت مستمر در طول فرایند واکنش صورت گیرد و یا تنها در پایان واکنش اندازه گیری شود. (۱۴)

تست اندوتوکسین کروموژنیک Kinetic وend-point

در روش Kinetic میزان اندوتوکسین بر اساس زمان واکنش نسبت به زمان واکنش در منحنی استاندارد غلظت اندوتوکسین محاسبه میشود.



در روش end-point-chromogenic خوانش نتیجه پس از مدت مشخصی از انکوباسیون اندازه گیری شده و میزان جذب در زمان مشخص ملاک اندازه گیری غلظت اندوتوکسین در نمونه خواهد بود.

سنجش اندوتوکسین به روش کدورت سنجی(Turbidimetric method)

در روش کدورت سنجی، میزان کدورت ایجاد شده در اثر واکنش LAL با اندوتوکسین اندازه گیری شده و برای تعیین میزان اندوتوکسین استفاده میشود. روش کدورت سنجی روش تغییر یافته از gel-clot است که قابلیت انجام اتوماتیک را دارا است. در این روش ترکیب LAL تغییر یافته ای استفاده میشود که مقدار کمتری از کواگلوژن نسبت به حالت عادی داشته و به همین دلیل به جای ایجاد لخته، در ماده ایجاد کدورت میکند. مزیت روش کدورت سنجی این است که یک روش کاملا کمی بوده و به دقت میتواند میزان اندوتوکسین را اندازه گیری نماید. (۱۲)

در سنجش اندوتوکسین به روش کدورت سنجی، میزان مشخصی از نمونه و محلول LAL در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و میزان کدورت ایجاد شده نسبت به منحنی استاندارد ارزیابی خواهد شد. این روش نیز مشابه روش رنگ سنجی، می تواند به صورت ادامه دار (سنجش کدورت به صورت پیوسته در کل زمان انکوباسیون) و یا به صورت سنجش در پایان زمان انکوباسیون انجام شود. از معایب روش کدورت سنجی این است که انجام این روش برای ترکیباتی که خود کدورت یا رنگ دارند دشوار یا امکان ناپذیر است.

انتخاب بهترین روش سنجش اندوتوکسین:

هر سه روش ذکر شده در این نوشته توسط فارماکوپه های معتبر اروپا، آمریکا، انگلیس و ژاپن مورد تایید بوده و از نظر سازمان غذا و داروی ایران تا تاریخ نگارش این مطلب، هر سه روش قابل قبول هستند. البته ممکن است برای دارو یا شرایط خاصی نیاز به روش مشخصی باشد که بسته به درخواست شما و استعلام های انجام شده از سازمان و مرور مطالب موجود در فارماکوپه روش بهینه برای درخواست شما اجرا خواهد شد. در آرک زیست آزما انجام تمامی روش های سنجش اندوتوکسین امکان پذیر است.

تست اندوتوکسین در سطوح

برای سنجش اندوتوکسین در دستگاه ها، سطوح یا ویال های مورد استفاده در فرایند دارویی، بایستی سطوح با استفاده از آب عاری از اندوتوکسین تیمار شده و پس از آن نمونه آب جهت ارزیابی وجود اندوتوکسین مورد استفاده قرار گیرد. (۸)

این میزان بسته به دستگاه مورد نظر متفاوت است، اما بایستی حداقل میزان آبی باشد که بتواند کلیه سطوح مورد آزمایش را پوشش دهد. برای ارزیابی آلودگی اندوتوکسین در مسیرهای آبی و لوله ها بایستی آب با دمای ۳۷ درجه از این مسیرها عبور داده شود. البته مدت زمان تماس آب با سیستم نباید کمتر از ۱ ساعت باشد. دستگاه یا ابزارهایی که کوچک بوده و قابلیت معلق شدن در آب را دارا هستند، بایستی به مدت بیشتر از ۶۰ دقیقه در آب با دمای ۳۷ تا ۴۰ درجه روی شیکر غوطه ور شوند.

استفاده از آب نامناسب و یا نمونه گیر اشتباه در این زمینه میتواند موجب جواب مثبت کاذب و یا منفی کاذب در آزمون اندوتوکسین گردد. لازم به ذکر است که شرایط عنوان شده، شرایط عمومی نمونه گیری LAL است و ممکن است شرایط نمونه گیری بسته به نوع دستگاه و شرایط مورد نظر متفاوت باشد.

پرورش خرچنگ نعل اسبی:

خرچنگ نعل‌اسبی (Horseshoe crab) که به فسیل زنده نیز مشهور است یکی از گونه های در حال انقراض است. خون این خرچنگ به علت وجود هموسیانین (به جای هموگلوبین) و وجود ترکیبات مس در هموسیانین، به رنگ آبی است. در خون خرچنگ نعل اسبی آمبوسیت ها نقش ایمنی زایی داشته و همین آمبوسیت ها در جنس L.polyphemus هستند که برای تولید ترکیب LAL مورد استفاده قرار میگیرند. (۵)

اگرچه در اوایل شناسایی تاثیر شگفت انگیز LAL باعث شده بود که نسل این خرچنگ ها به خطر بیفتد، اما فراگیر شدن استفاده از LAL کم کم باعث شد که توجه بیشتری به خرچنگ نعل اسبی صورت گرفته و امروزه فارم های مصنوعی زیادی جهت پرورش، تکثیر و نگهداری از خرچنگ نعل اسبی ایجاد شده است. این فارم ها خرچنگ را پرورش داده و از خرچنگ به اندازه ای خون استخراج میکنند که تهدیدی برای سلامت موجود نبوده و مجدد آن را به فارم باز میگردانند.

تجارت پر سود LAL باعث شده امروزه شرکت های بزرگی به تولید کیت و مواد اولیه برای سنجش اندوتوکسین اقدام کنند و مراکز بزرگ پرورش خرچنگ نعل اسبی در سراسر جهان ایجاد شود. امروزه شرکت های بزرگی در دنیا تولید کننده ترکیبات

مرتبط با اندوتوکسین هستند که پر استفاده ترین کیت اندوتوکسین در ایران کیت های لونزا، اندوسیف و بیواندو هستند. کیت اندوتوکسین لونزا، ساخت شرکت سوئیسی و معروف لونزا ، کیت اندوتوکسین ENDOSAFE ساخت شرکت آمریکایی Charles River Laboratories که امروزه در تمام جهان گسترش پیدا کرده و کیت اندوتوکسین Bioendo از شرکت Xiamen Bioendo Technology Co., Ltd چین هستند. (۱۱)

تست اندوتوکسین (تب زایی) به روشLAL

تست اندوتوکسین یا تست تب زایی بر طبق USP 41 بخش ۸۵ برای محصولات دارویی و بخش ۱۶۱ برای تجهیزات پزشکی انجام می‌گیرد. به طور کلی برای تست اندوتوکسین یا تب زایی باید بدانید که اندوتوکسین ها بخش‌هایی از دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی هستند که از اوایل دهه ۱۹۰۰میلادی به خاطر اثرات گرمازایی خود (تب القایی) شناخته شده‌اند و اهمیت آنها به علت تاثیر بر سیستم ایمنی می‌باشد.

اندوتوکسین ها اغلب به خاطر ساختار خود که شامل یک بخش لیپیدی (چربی، بخش تحریک کننده سیستم ایمنی، دارای کمترین تنوع) و یک بخش پلی‌ساکاریدی (بخش متمایز کننده هر سویه، دارای تنوع بالا در طول زنجیره) می‌باشند، لیپو پلیساکارید LPS نامیده میشوند. توکسین ها معمولاً در فاز لگاریتمی (Exponential growth) رشد باکتری ها ترشح می شوند و قاعدتاً هم از باکتری های زنده تولید می شوند اما همانطور که گفته شد در برخی موارد مانند باکتری دیفتری ، توکسین پس از لیز باکتری در محیط آزاد می‌شود. (۹)

تست تب زایی عاملی مهم برای جلوگیری از مرگ افراد

این عوامل تب زا به دلیل ایجاد حساسیت در بدن افراد به شدت می‌توانند خطرناک باشند و حتی سبب مرگ فرد شوند. از این رو تشخیص آنها و انجام تست تب زایی قبل از استفاده از محصولات حوزه پزشکی ضروری است.

در تست اندوتوکسین یا تب زایی به روش LAL غلظت بحرانی برای اندوتوکسین ها در سیستم‌های آزمون برون‌تنی، بر اساس سیستمی که به کار می‌روند متغییر است. مقدار ۰،۰۰۱ ngاندوتوکسین، IL-1و TNF را در ماکروفازهای انسانی فعال می‌کند. در حالی که مقدار ۰،۰۰۴۸ ngاندوتوکسین، پاسخ‌های زیستی نامحسوسی را در سلول‌های دندریتیک انسان یا سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی القا می‌کند.

تست تشخیص تب‌زایی به صورت Invivo و اغلب به شیوه LAL Gel-clot انجام می‌گیرد. در تست اندوتوکسین (تب زایی) به روشLAL ، اندوتوکسین‌ها فاکتوری را در عصاره خونی آبی رنگ خرچنگ نعل اسبیlimulus amebocyte lysate (LAL) فعال می‌کنند. (۷)

این امر در تست تب زایی موجب 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 که کواگولین‌ها هستند، از طریق باند دی سولفیدی به طورخود به خودی به یکدیگر متصل می‌شوند و درنتیجه باعث کدورت LAL می‌شوند. در نهایت نیز یک لخته ژلی تشکیل می‌شود. تشکیل لخته پس از واژگونی لولی‌های آزمایش به وسیله چشمی تعیین می‌شود.

تست اندوتوکسین (تب زایی) به روشLAL

تست تشخیص اندوتوکسین بر طبق USP 41 بخش ۸۵ برای محصولات دارویی و بخش ۱۶۱ برای تجهیزات پزشکی انجام می‌گیرد.

به طور کلی، اندوتوکسین‌ها بخش‌هایی از دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی هستند که از اوایل دهه ۱۹۰۰میلادی به خاطر اثرات گرمازایی خود (تب القایی) شناخته شده‌اند و اهمیت آنها به علت تاثیر بر سیستم ایمنی می‌باشد. اندوتوکسین‌ها اغلب به خاطر ساختار خود که شامل یک بخش لیپیدی (چربی، بخش تحریک کننده سیستم ایمنی، دارای کمترین تنوع) و یک بخش پلی‌ساکاریدی (بخش متمایز کننده هر سویه، دارای تنوع بالا در طول زنجیره) می‌باشند، لیپو پلیساکارید LPS نامیده میشوند. توکسین ها معمولاً در فاز لگاریتمی (Exponential growth) رشد باکتری ها ترشح می شوند و قاعدتاً هم از باکتری های زنده تولید می شوند اما همانطور که گفته شد در برخی موارد مانند باکتری دیفتری ، توکسین پس از لیز باکتری در محیط

آزاد می‌شود. (۶) این عوامل تب‌زا به دلیل ایجاد حساسیت در بدن افراد به شدت می‌توانند خطرناک باشند و حتی سبب مرگ فرد شوند. از این رو تشخیص آنها قبل از استفاده از محصولات حوزه پزشکی ضروری است. غلظت بحرانی برای اندوتوکسین‌ها در سیستم‌های آزمون برون‌تنی، بر اساس سیستمی که به کار می‌روند متغییر است. مقدار ۰،۰۱ ngاندوتوکسین، IL-1و TNF را در ماکروفازهای انسانی فعال می‌کند. در حالی که مقدار ۰،۰۴۸ ngاندوتوکسین، پاسخ‌های زیستی نامحسوسی را در سلول‌های دندریتیک انسان یا سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی القا می‌کند . تشخیص تب‌زایی به صورت Invivo و اغلب به شیوه LAL Gel-clot انجام می‌گیرد. در تست اندوتوکسین (تب زایی) به روشLAL ، اندوتوکسین‌ها فاکتوری را در عصاره خونی آبی رنگ خرچنگ نعل اسبی limulus amebocyte lysate (LAL) فعال می‌کنند.

این امر موجب 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 که کواگولین‌ها هستند، از طریق باند دی‌سولفیدی به طورخودبه‌خودی به یکدیگر متصل می‌شوند و درنتیجه باعث کدورت LAL می‌شوند. در نهایت نیز یک لخته ژلی تشکیل می‌شود. تشکیل لخته پس از واژگونی لولی‌های آزمایش به وسیله چشمی تعیین می‌شود. (۱۰)

لیمولوس آمبوسیت لیزات (LAL) عصاره آبی سلول های خونی (آمبوسیت ها) از خرچنگ نعل اسبی اقیانوس اطلس Limulus polyphemus است. LAL با لیپوپلی ساکارید اندوتوکسین باکتریایی(LPS) ، که جزء غشایی باکتری های گرم منفی است، واکنش می دهد . این واکنش اساس آزمایش LAL است که به طور گسترده برای تشخیص و کمیت اندوتوکسین های باکتریایی استفاده می شود.

در آسیا، آزمایش مشابه تاکیپلئوس آمبوسیت لیزات (TAL) بر اساس خرچنگ های نعل اسبی محلی Tachypleus gigasیا Tachypleus tridentatus گاهی اوقات به جای آن استفاده می شود. .سنجش فاکتور نوترکیب C (rFC)جایگزینی برای LAL/TAL بر اساس یک واکنش مشابه است.

زمینه

فرد بنگ ، محقق آمریکایی آمریکایی در سال ۱۹۵۶ گزارش داد که باکتری های گرم منفی، حتی اگر کشته شوند، باعث می شوند خون خرچنگ نعل اسبی به یک توده نیمه جامد تبدیل شود .بعداً مشخص شد که سلول‌های خونی حیوان، سلول‌های متحرک به نام آمیبوسیت‌ها ، حاوی گرانول‌هایی با یک فاکتور لخته‌کننده به نام منعقدکننده هستند . هنگامی که با اندوتوکسین باکتریایی مواجه می شود، این در خارج از سلول آزاد می شود .تصور می‌شود که انعقاد (ژل) حاصل حاوی عفونت‌های باکتریایی در سیستم گردش خون نیمه بسته حیوان است . تجزیه و تحلیل مدرن از lysate منجر به درک این سیستم آبشاری شده است، با آنزیم های متعددی که به ترتیب برای تولید ژل کار می کنند .نقطه ورود لخته شدن ناشی از اندوتوکسین فاکتور لخته شدن لیمولوس C است. (۱)

در سال ۱۹۷۷ سازمان غذا و داروی ایالات متحده LAL (FDA) را برای آزمایش داروها، محصولات و وسایلی که با خون در تماس هستند تأیید کرد .قبل از آن تاریخ، آزمایش بسیار کندتر و گران‌تری روی خرگوش‌ها برای این منظور استفاده می‌شد.

خرچنگ های نعل اسبی جمع آوری می شوند و خون از پریکارد خرچنگ نعل اسبی خارج می شود . سپس خرچنگ ها به آب بازگردانده می شوند .تولیدکنندگان LAL نرخ مرگ و میر ۳٪ را در خرچنگ های خون ریزی شده اندازه گیری کرده اند .با این حال، مطالعات اخیر نشان می دهد که این عدد ممکن است نزدیک به ۱۵٪ یا حتی ۳۰٪ باشد. سلول‌های خونی با استفاده از سانتریفیوژ از سرم جدا می‌شوند و سپس در آب مقطر قرار می‌گیرند که باعث متورم شدن و ترکیدن آنها می‌شود ("لیز") .این مواد شیمیایی را از داخل سلول آزاد می کند ("لیز")، که سپس خالص شده و در انجماد خشک می شود .برای آزمایش یک نمونه از نظر اندوتوکسین، آن را با لیزات و آب مخلوط می کنند .در صورت وقوع انعقاد، اندوتوکسین ها وجود دارند.

تستLAL

سه روش اساسی وجود دارد: ژل لخته، کدورت سنجی و کروموژنیک .کاربرد اصلی LAL آزمایش داروها و وسایل پزشکی تزریقی است که با خون یا مایع مغزی نخاعی تماس دارند . در ایالات متحده، FDAدستورالعملی را برای تأیید اعتبار آزمایش LAL به عنوان آزمایش اندوتوکسین برای چنین محصولاتی منتشر کرده است.

آبشار LAL نیز توسط-D- β- گلوکان ، از طریق فاکتور G متفاوت تحریک می شود. ، موادی که باعث ایجاد پاسخ های التهابی در پستانداران می شود. (۱۶)

غلبه بر مهار و افزایش

یکی از زمان‌برترین جنبه‌های آزمایش اندوتوکسین با استفاده ازLAL ، پیش تیمار کردن نمونه‌ها برای غلبه بر مهار سنجش است که ممکن است با آزمایش LAL تداخل داشته باشد به طوری که بازیابی اندوتوکسین تحت تأثیر قرار گیرد .اگر محصول مورد آزمایش باعث شود که بازیابی اندوتوکسین کمتر از حد انتظار باشد، محصول برای آزمایش LAL بازدارنده است .محصولاتی که باعث ایجاد مقادیر بالاتر از حد انتظار می شوند، در حال افزایش هستند .غلبه بر خواص بازدارندگی و تقویت یک محصول توسط FDA به عنوان بخشی از اعتبار سنجی آزمایش LAL برای استفاده در آزمایش انتشار نهایی مواد تزریقی و تجهیزات پزشکی مورد نیاز است .قبل از اینکه بتوان از LAL برای آزادسازی محصول استفاده کرد، بازیابی صحیح اندوتوکسین باید ثابت شود. (۴)

جایگزین، گزینه ها

تست LAL منبع اصلی وابستگی به محصولات حیوانی در صنعت زیست پزشکی و چالشی برای سه Rs علم در رابطه با استفاده از حیوانات در آزمایش است .با گزارش‌های مربوط به نرخ‌های مرگ‌ومیر بالاتر از پیش‌بینی‌شده ، ابداع جایگزین‌هایی برای آزمایش اخلاقی‌تر تلقی می‌شود. این ایده که دور شدن از LAL برای کاهش استفاده از خرچنگ‌های نعل اسبی اقیانوس اطلس به تلاش‌های حفاظتی کمک می‌کند، باید به دقت ارزیابی شود، زیرا حرکت به سمت rFC می‌تواند با به خطر انداختن تلاش‌های حفاظتی که بسیاری برای اجرای آن مبارزه کرده‌اند، اثرات معکوس ایجاد کند، یک جایگزین پروتئین نوترکیب برای استفاده در آزمایش LAL به صورت تجاری در دسترس بوده است .این آزمایش که سنجش فاکتور C نوترکیب (rFC) نام دارد، بر اساس همان پروتئین فاکتور C انعقادی Limulus است که توسط سلول‌های حشرات اصلاح‌شده ژنتیکی تولید می‌شود(توالی خاص عامل C مورد استفاده لزوماً از خرچنگ نعل اسبی اقیانوس اطلس نمی آید).

به جای تقلید از کل مسیر انعقادی، آزمایش‌های rFC به فاکتور C اجازه می‌دهند یک مولکول فلوروژنیک را بشکافد، به طوری که وقتی اندوتوکسین فاکتور را فعال می‌کند، نمونه روشن می‌شود .از آنجایی که حاوی فاکتور G نیست، -D-β-گلوکان باعث ایجاد مثبت کاذب نمی شود . از سال ۲۰۱۸، شواهد موجود نشان می دهد که تست rFC بدتر از تست LAL نیست.

پذیرش آزمایش rFC کند بود، که در سال ۲۰۱۲ زمانی که FDA ایالات متحده و وزارت بهداشت اروپا آن را به عنوان یک جایگزین پذیرفته شده تأیید کردند، شروع به تغییر کرد .عدم ذکر آن در Pharmacopeias همچنان یک مسئله باقی مانده است، زیرا استاندارد خوبی برای اجرای آزمایش در تولید وجود نداشت. در سال ۲۰۱۶، به فارماکوپه اروپا اضافه شد . یک حق ثبت اختراع در rFC نیز پذیرش را تا انقضای آن در سال ۲۰۱۸ محدود کرد.

در ۱ ژوئن ۲۰۲۰، داروسازی ایالات متحده (USP) تصمیم گرفت پیشنهاد گنجاندن فناوری نوترکیب برای آزمایش اندوتوکسین در فصل <85>اندوتوکسین های باکتریایی را لغو کند و توسعه فصل جداگانه ای را آغاز کند که کاربرد، اعتبار سنجی و مقایسه را گسترش می دهد. آزمایشات اندوتوکسین بر اساس معرف های مشتق شده نوترکیب .تنها یک راهنمای جداگانه تنها فصل ۱۰۸۵,۱ توسط USP پیشنهاد شد، اگرچه نظرات و بازخوردهای منتشر شده در ۱۱ دسامبر ۲۰۲۰ نشان می‌دهد که شرکت‌های داروسازی و FDA از این فصل پشتیبانی نمی‌کنند و درخواست وضعیت تکمیلی دارند. (۸)

تست فعال سازی مونوسیت

تست فعال سازی مونوسیت (MAT) روش پیشنهادی دیگری برای آزمایش اندوتوکسین ها بر اساس مونوسیت ها در خون انسان است. انتشار سیتوکین‌ها را به دلیل وجود پیروژن‌ها اندازه‌گیری می‌کند ، که اساساً فرآیندی را که در آن این سموم

باعث ایجاد تب در انسان‌ها (و خرگوش‌ها، مانند آزمایش اصلی پایوژن) می‌شود، منعکس می‌کند. یک پروتکل برای تست MAT، با استفاده از سلول های کشت شده، در داروسازی اروپایی شرح داده شده است.

یک مطالعه اخیر با استفاده از مونوسیت‌های دستکاری شده ژنتیکی توانست به طور قابل‌توجهی حساسیت سنجش‌های تشخیص مبتنی بر مونوسیت را با کاهش زمان تکمیل سنجش از بیش از ۲۰ ساعت به ۲ تا ۳ ساعت افزایش دهد.

تست لیمولوس آمیبوسیت لیزات

آزمایش لیمولوس آمیبوسیت لیزات (LAL) یک روش ساده برای تشخیص باکتری های گرم منفی زنده و غیرقابل حیات است. برخی از لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی (یعنی اندوتوکسین‌ها) این گروه باکتریایی منجر به ژل شدن سلول‌های خونی (آمبوسیت‌ها) لیمولوس پلی‌فموس می‌شوند.

چندین کیت تست در دسترس است .تست LAL که بیشتر برای کنترل تب‌زای محصولات دارویی استفاده می‌شود، برای غذاهای حاوی گرم منفی مانند گوشت تازه، شیر و تخم‌مرغ قابل استفاده است .زمینه دیگر کاربرد ممکن است ارزیابی گذشته نگر کیفیت میکروبیولوژیکی محصولات گرم شده باشد. (۵)

همولنف خرچنگ نعل اسبی (HSC) منبع لیمولوس آمبوسیت لیزات (LAL) است، یک جزء حیاتی در آزمایش عقیمی که ایمنی دارو و تجهیزات پزشکی را برای میلیون‌ها بیمار در سال تضمین می‌کند .جمعیت HSC وحشی در نتیجه استفاده از آن به عنوان طعمه مارماهی، تغییرات محیطی، و گرفتن و خونریزی برای همولنف توسط صنایع زیست پزشکی کاهش یافته است، بنابراین خطرات قابل توجهی برای زنده ماندن گونه ها و زنجیره تامین مواد خام LAL ایجاد می کند .ما یک زیستگاه کنترل‌شده آبزی‌پروری برای شوهر HSCs طراحی کردیم و اثرات اسارت را بر نشانگرهای سلامتی (مانند تراکم آمبوسیت، سطح هموسیانین، و فعالیتLAL) ارزیابی کردیم .ما دریافتیم که آبزی پروری HSC عملی است، با برداشت همولنف معمولی که منجر به کیفیت LAL بالا می شود، در حالی که از سلامت حیوانات با ۱۰۰٪ بقای HSC محافظت می کند .به علاوه، برداشت همولنف با ضربه کم از طریق یک کاتتر ساکن، سینتیک بازگشت سریع آمبوسیت را پس از استخراج همولنف ۱۰ درصدی متوالی نشان داد .منابع پایدارLAL همچنین می تواند برای رسیدگی به روندهای دلهره آور در سپتی سمی و مقاومت ضد میکروبی تطبیق داده شود. LAL به طور منحصر به فردی برای باکتری های گرم منفی حساس و اختصاصی است که ۷۰ تا ۸۰ درصد از عوامل بیماری زا را نشان می دهد که معمولاً منجر به سپسیس می شوند .با این حال، نتایج نامنظم مرتبط با مواد مزاحم، تلاش‌ها برای تطبیق LAL برای استفاده بالینی در گذشته را تحت تأثیر قرار داد .ما توسعه یک روش جدید مبتنی بر LAL را گزارش می‌کنیم که می‌تواند باکتری‌های گرم منفی و اندوتوکسین‌ها را در خون انسان بدون تداخل با استفاده از LAL مشتق شده از آبزی پروری تشخیص دهد.

با این حال، آزمایش LAL در خون انسان از نظر تاریخی مشکل‌ساز بوده است، با تنوع قابل‌توجهی به دلیل وجود مواد مداخله‌گر که این سنجش را سرکوب کرده یا به‌طور جعلی فعال کرده‌اند . تلاش‌های اولیه برای ارزیابی LAL برای تشخیص اندوتوکسین‌ها در خون بیمار به دلیل فقدان رویه‌های استاندارد شده که اغلب شامل دستکاری گسترده نمونه می‌شد، تا حد زیادی کنار گذاشته شد . به طور خاص، یکی از روش های منتشر شده LAL نیاز به رقت نمونه قابل توجهی دارد (تا ۴۰ برابر؛ ، دناتوره کردن (گرمایش در ۷۰ درجه سانتیگراد)، و افزودن بازدارنده های شیمیایی .در حالی که رقت‌سازی می‌تواند حساسیت را محدود کند و پیچیدگی کلی عملی بودن را به عنوان یک روش غربالگری سریع بیمار کاهش می‌دهد . همچنین نشان داده شده است که داروهای ضد انعقاد، مهارکننده‌های شیمیایی و تغییرات pH خون ناشی از دما پس از آماده‌سازی، با قابلیت اطمینان سنجش LAL تداخل دارند (Gnauck et al., 2016) . علاوه بر این، نسبت ها و عملکرد اجزای لخته شدن در معرف های LAL ترکیبی از برداشت تصادفی خرچنگ نعل اسبی وحشی (HSC، Limulus polyphemus) متغیر است، که می تواند بر سینتیک واکنش، حساسیت LPS تأثیر بگذارد و منجر به تغییرات دسته به دسته شود . (۹)

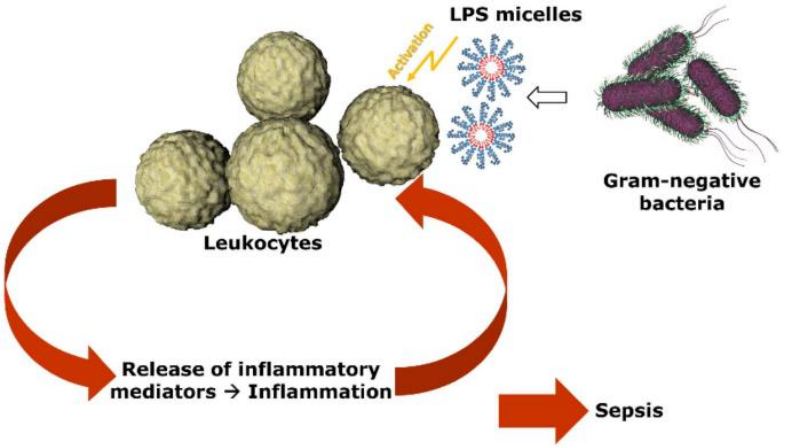
از منظر حفاظت، یک برنامه بالینی برای LAL ممکن است امکان پذیر نباشد، زیرا منابع طبیعی LAL در حال حاضر توسط آزمایش عقیمی دارویی تحت فشار قرار گرفته اند .سالانه، حدود ۶۰۰۰۰۰ HSC برای برآوردن تقاضای LAL دستگیر و خون

ریزی می شود، که حدود ۳۰٪ آنها در این فرآیند منقضی می شوند .تهدیدهای کنونی برای جمعیت‌های HSC وحشی نه تنها شامل برداشت زیست‌پزشکی، بلکه تجاوز به زیستگاه، گرم شدن کره زمین و استفاده از آن به عنوان طعمه برای ماهیگیری مارماهی و ماهی‌ماهی است که بر تعداد جمعیت تأثیر منفی گذاشته است. آینده نامشخصHSC ها و اهمیت LAL برای پزشکی مدرن، نوآوری هایی را برای کشت پایدار HSC برانگیخته است . به این ترتیب، آبزی پروری به یک رویکرد امیدوارکننده برای بازگرداندن جمعیت های رو به کاهش تبدیل شده است .با این حال، تلاش‌های طولانی‌مدت برای شوهر دادنHSC های بالغ تا حد زیادی در سه دهه گذشته گزارش نشده یا ناموفق بوده است . پس از ۳ تا ۴ ماه پرورش، تحقیقات نشان داده است که غلظت پروتئین همولنف به زیر محدوده مرجع (۱۱،۸-۳،۴ میلی گرم در میلی لیتر) می رسد و منجر به مرگ و میر می شود، که تصور می شود با کمبودهای تغذیه ای مرتبط است که منجر به پان هیپوپروتئینمی می شود .

اولین هدف این مطالعه توسعه و بهینه سازی یک سیستم آبزی پروری چرخشی داخلی (RAS) برای پرورش HSC در اسارت بود که برداشت مکرر LAL را در عین حفظ رفاه حیوانات تسهیل کند .یک کاتتر کاشته شده با جراحی برای دستیابی به یک روش برداشت معمولی و کم تاثیر ایجاد شد .در این مطالعه، فعالیت‌های هموسیانین(Hc) ، آمبوسیت و LAL برای بررسی تأثیر آبزی پروری برHSC های بالغ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت .این پارامترهای سلامت نقش اساسی در ایمنی برای دفاع در برابر پاتوژن ها و تضمین سلامت کلی HSC ها دارند . منطق پشت این هدف این بود که آبزی پروری کنترل شده می تواند جایگزینی برای شیوه های فعلی باشد و با ایجاد یک منبع آزمایش اندوتوکسین پایدارتر از گروه محدودی از HSC های اسیر، جایگزینی برای فعالیت های کنونی فراهم کند و حفاظت را تقویت کند .گسترش منابع LAL به سمت پزشکی بالینی نیز باید بر روش های مسئول جمع آوری مواد خام تأکید کند .ایجاد یک مدل آبزی پروری که بتواند حجم بیشتری از LAL را به طور قابل اعتماد، پایدار و اقتصادی تولید کند، به نفع طبیعت و صنعت خواهد بود .جمع آوری دقیق LAL از HSC های نظارت شده و به خوبی نگهداری شده در آبزی پروری می تواند مقدار عرضه LAL را افزایش دهد، زنده ماندن گونه ها را تضمین کند و امکان نوآوری های بالینی جدید را فراهم کند .هدف دوم این مطالعه نشان دادن استفاده بالقوه از LAL مشتق شده از آبزی پروری به عنوان یک ابزار سریع و قابل اعتماد بود. (۱۳)

اندوتوکسین یکی از اجزای اصلی دیواره سلولی خارجی باکتری های گرم منفی است و بسیار سمی است .دوزهای داخل وریدی کمتر از ۱ نانوگرم بر کیلوگرم وزن بدن در ساعت باعث پاسخ التهابی در انسان می شود . اندوتوکسین ها لیپوپلی ساکاریدها (LPS)هستند که از یک پلی ساکارید آبدوست و یک دامنه لیپید چربی دوست (نقطه لیپیدA) تشکیل شده اند. LPSیک محرک قوی واکنش های التهابی است، در غلظت های بسیار کم عمل می کند و در پاتوژنز سپسیس، شوک سپتیک و اندوتوکسمی نقش دارد . LPS از دیواره سلولی باکتری های در حال رشد یا زمانی که آنتی بیوتیک ها یا سیستم کمپلمان باکتری ها را می کشند آزاد می شود. LPSکه وارد سیستم گردش خون می شود، پاسخ التهابی مونوسیت ها و ماکروفاژها را آغاز می کند که منجر به تولید سیتوکین های پیش التهابی مانند TNF-α و IL-1β می شود و تولید مولکول های تحریک کننده مشترک مورد نیاز برای پاسخ ایمنی تطبیقی را فعال می کند . با این حال، در موارد شدید، التهاب از کنترل خارج می شود و در نهایت می تواند منجر به سپسیس یا نارسایی اندام شود (شکل 1) .

شکل ۱



LPS ایمنی ذاتی را تحریک می کند. LPSدر خون مونوسیت ها را فعال می کند که منجر به ترشح واسطه های التهابی می شود. در التهاب سیستمیک، این می تواند منجر به نارسایی چند عضوی و سپسیس شود.

تستLAL ، اندوتوکسین باکتریایی و پیروژن - فارم/بیوفارم

تست - LAL تست اندوتوکسین باکتریایی

آزمایش LAL (لیمولوس آمبوسیت لیزات) که به عنوان تست اندوتوکسین باکتریایی نیز شناخته می شود، یک سنجش آزمایشگاهی است که برای تشخیص حضور و غلظت اندوتوکسین های باکتریایی در داروها و محصولات بیولوژیکی استفاده می شود و بخش مهمی از میکروبیولوژی دارویی است .اندوتوکسین ها که نوعی پیروژن هستند، لیپوپلی ساکاریدهایی هستند که در دیواره سلولی باکتری های گرم منفی وجود دارند .پیروژن ها به عنوان یک کلاس، موادی هستند که تب را تحریک می کنند و اگر بیش از غلظت های خاص برای انسان تجویز شوند، می توانند مضر یا حتی کشنده باشند. (۱۶)

تیم آزمایش اندوتوکسین باکتری LAL درPacific BioLabs ، سنجش اندوتوکسین باکتریایی LAL Kinetic Chromogenicرا انجام می دهد، یک سنجش رنگ سنجی حساس که می تواند سطوح اندوتوکسین باکتریایی را در محلول هایی با غلظت های کمتر از ۰,۰۰۵ EU/mLتشخیص دهد.

علاوه بر فرآورده های دارویی، آب می تواند منبع تب زا نیز باشد .بنابراین، ممکن است انجام آزمایش اندوتوکسین برای پایش منظم سیستم های آب مهم باشد.

روش آزمایش اندوتوکسین باکتریایی

دلیل اینکه آزمایش اندوتوکسین باکتریایی LAL یا آزمایش لیمولوس آمبوسیت نیز نامیده می شود این است که لیزات سلول های خونی (آمبوسیت ها) از خرچنگ های نعل اسبی (نام لاتین limulus Polyphemus است .(لیزات حاصل از سلول های خونی خرچنگ نعل اسبی با اندوتوکسین های باکتریایی واکنش نشان می دهد.

نمونه ها با معرف LAL در یک صفحه ۹۶ چاهی مخلوط می شوند و یک صفحه خوان تغییر رنگ را در طول زمان اندازه گیری می کند. مایع موجود در چاهک ها با گذشت زمان زردتر می شود و سرعت آن تغییر رنگ متناسب با مقدار اندوتوکسین موجود در نمونه است. تأثیر ترکیبات بازدارنده با استفاده از روش کروموژنیک جنبشی نسبت به سایر روش ها تأثیر کمتری دارد .علاوه بر این، روش کروموژنیک جنبشی نسبت به سایر روش‌های تست LAL حساس‌تر است.

تست پیروژن خرگوش

تست پیروژن خرگوش در یک آزمایش in vivo برای تشخیص کیفی تب زا .خرگوش‌ها تحمل تب‌زای مشابهی با انسان دارند، بنابراین با مشاهده تغییر دمای بدن در خرگوش‌ها می‌توان وجود پیروژن‌ها را تعیین کرد .این روش می تواند پیروژن های اندوتوکسین غیر باکتریایی و همچنین اندوتوکسین های باکتریایی را شناسایی کند.

خدمات تست اندوتوکسین و پیروژن موجود

- روش LAL کروموژنیک جنبشی (برای اندوتوکسین های باکتریایی) - در شرایط آزمایشگاهی

- (اندازه نمونه ۱۰ میلی لیتر برای آب مورد نیاز است؛ در صورت نیاز برای ظروف با PBL تماس بگیرید).
- USP / JP / EP / ISO(با واسطه مواد) تست تب زا خرگوشin vivo -

درباره LAL اندوتوکسین و آزمایش پیروژن خرگوش بیشتر بخوانید

- مرکز آموزشی - PBL انتظارات CMC دارویی
- مرکز آموزشی - PBL فعالیت های CMC برای آنتی بادی های بیولوژیک و مونوکلونال
- مرکز یادگیری - PBL میکروبیولوژی جامع(۱۴)

تست LAL در کجا و چرا انجام می شود؟

تست LAL (مخففLimulus Amebocyte Lysate) آزمایشی برای تعیین اندوتوکسین های باکتریایی است که از آمبوسیت لیزات خرچنگ لیمولوس استفاده می کند .در این آزمایش از واکنش هایی که در آمبوسیت لیزات در نتیجه مکانیسم دفاعی خرچنگ در حضور اندوتوکسین ها رخ می دهد و با فرآیند ژل شدن خاتمه می یابد، استفاده می شود .این آزمایش‌ها مکانیسم‌های تشخیصی مانند ظاهر ژل یا تغییر رنگ دارند که زمانی رخ می‌دهد که کروموفور به محیط اضافه می‌شود تا تغییر رنگ مربوط به واکنش‌های ایجاد شده توسط اندوتوکسین‌ها حاصل شود.

معرف های LAL اختصاصی اندوتوکسین

نام‌گذاری تست‌های LAL بر اساس مکانیسم تشخیص است، مانند روش لخته شدن ژل ، روش کروموژنیک یا روش کدورت‌سنجی . به همین ترتیب، زمانی که هدف آزمایش این است که بدانیم آیا اندوتوکسین های باکتریایی در یک محیط وجود دارد یا خیر، یا زمانی که نیاز به دانستن غلظت اندوتوکسین های باکتریایی وجود دارد، می توان از این روش ها به صورت کیفی استفاده کرد.

تست LAL در محیط های مختلفی مانند صنعت داروسازی، کارخانه های تجهیزات پزشکی، بیمارستان ها یا مراکز تحقیقاتی انجام می شود .در تولید داروها و به ویژه داروهایی که قرار است به صورت تزریقی تجویز شوند، کنترل حضور اندوتوکسین های باکتریایی بسیار مهم است .دلیل این امر این است که اگر دارو حاوی سموم باشد، این سموم مستقیماً به جریان خون حیوان یا شخصی که دارو برای او تجویز می شود می رود. آزمایش LAL به عنوان روشی برای کنترل عوامل تب زا در تمام مراحل تولید داروها و محصولات بیولوژیکی انجام می شود. تست LAL از دهه ۸۰ برای کنترل کیفیت این محصولات روش ارجح بوده است. (۱۱)

تعیین اندوتوکسین ها در پلاسما از طریق روشLAL

نیاز به انجام آزمایش LAL در سمیت اندوتوکسین های باکتریایی نهفته است .این سموم که به صورت درون زا در باکتری های گرم منفی وجود دارند، به دلیل اینکه بخشی از غشای باکتری هستند، با مرگ باکتری در محیط آزاد می شوند .اندوتوکسین های باکتریایی برای پستانداران خطرناک هستند و باعث عفونت هایی می شوند که در بسیاری از موارد می تواند کشنده باشد .با توجه به مقاومت بالای این سموم، انجام آزمایش LAL در محیط های مختلف و کنترل تمامی محیط هایی که امکان انتشار آنها وجود دارد، ضروری است.

بخش LAL Wako محصولات مختلفی را برای انجام تست LAL از طریق روش‌های مختلفی که می‌توان این تست را انجام داد، ارائه می‌کند .کیت رنگی Limulus KY تست واکو برای تعیین اندوتوکسین ها از طریق روش کروموژنیک است .این آزمایش را می توان با روش نقطه پایانی یا روش سینتیکی انجام داد .روش کدورت سنجی در کیت های ES-F در قالب های ارائه شده توسط Wako به مشتریان خود (آزمایش Limulus ES-2 و PYROSTAR™ ES-F/Plate) استفاده می شود .از طرفی تستLimulus ES II Wako بر اساس روش ژل لخته است .با انتخاب مناسب، این کیت ها می توانند تعیین اندوتوکسین ها را در محیط های مختلف انجام دهند. (۴)

نتیجه گیری :

در سال ۱۹۸۳، روش لیمولوس آمبوسیت لیزات (LAL) توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) برای آزمایش کنترل کیفیت دارویی تایید شد و به دلیل سادگی، اختصاصی بودن و به دلیل سادگی، اختصاصی بودن و به عنوان تست آندوتوکسین باکتریایی انتخابی برای تشخیص پاتوژن های گرم منفی تبدیل شد. حساسیت (هوشتین، ۱۹۹۰ ؛ کوپر، ۲۰۰۱). اکتشافات اولیه تشکیل لخته ژل سفت و لحظه ای را بر اثر قرار گرفتن در معرض LAL با لیپوپلی ساکاریدها (LPS) در قسمت در تریلیون نشان داد(Roslansky and Novitsky, 1991) . آبشار لخته شدن و روش تشخیص ژل LPS در شکل ۱ نشان داده شده است LPS .به عنوان یک مولکول بسیار سمی و پایدار در برابر حرارت، تقریباً ۷۰ درصد از غشای خارجی باکتری های گرم منفی را تشکیل می دهد. حساسیت منحصر به فرد (۰,۰۵-۵۰EU/ml) و ویژگی LAL پتانسیل آن را برای تشخیص LPS در خون انسان با نشانه های بالینی مهم به عنوان حساس ترین و سریع ترین روش برای تشخیص اندوتوکسین مشخص می کند (اداره غذا و دارو[FDA] ، 1987؛ Hochstein (، 1990) با ویژگی تا ۸۰ درصد از عوامل بیماری زا که معمولاً منجر به سپسیس می شوند(MacVane, 2017) .

از دیدگاه بالینی، فقدان ابزار برای تشخیص زودهنگام اندوتوکسین های منتقله از خون، از جملهLPS ، اغلب منجر به تجویز نامناسب آنتی بیوتیک می شود .(Baker et al., 2018) آنتی بیوتیک ها ریزش LPS از غشای خارجی باکتری های گرم منفی را تسریع می کنند و واسطه های التهابی را آزاد می کنند(Jean-Baptiste, 2007) . بنابراین، تشخیص زودهنگام و درمان آگاهانه و به موقع می تواند به کاهش سطح LPS در طول سپسیس کمک کند، به طور بالقوه اثرات سمی آن را به حداقل برساند و نرخ بقای بیمار را بهبود بخشد . به این ترتیب، با تجویز مناسب آنتی بیوتیک ۷,۶ درصد در ساعت افزایش می یابد . با این حال، روش‌های آزمایشگاهی مرسوم برای شناسایی باکتری‌ها در خون انسان از زمان ظهور کشت، که اغلب به ۲ تا ۳ روز برای نتایج آزمایش نیاز دارد، پیشرفت قابل‌توجهی نداشته است . (۳)

منابع :

1. Sheng J, Zhou J, Peng Y, Zhu Z, Chen L (1 January 2006). "Tachypleus Amebocyte Lysate Test Using in Transfusion Reaction". Chinese Journal of Nosocomiology (in Chinese).
2. "Endotoxin Testing Manufacturers and Conservation". www.horseshoecrab.org. Retrieved 10 March 2020.
3. Greer S. "Frederik Bang". JH Bloomberg School of Public Health. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health.
4. Iwanaga S (May 2007). "Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins". Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences. 83 (4): 110–9. Bibcode:2007PJAB...83..110I. doi:10.2183/pjab.83.110. PMC 3756735. PMID 24019589.
5. Jump up to: Zhang S (9 May 2018). "The Last Days of the Blue-Blood Harvest". The Atlantic. Retrieved 15 May 2018.
6. "Crash: A Tale of Two Species - The Benefits of Blue Blood". PBS. 10 June 2008.
7. "The History of Limulus and Endotoxin". Marine Biological Laboratory. Archived from the original on 28 October 2008.
8. "Guidance for Industry: Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers". U.S. Food and Drug Administration. Retrieved 5 March 2019.
9. Sandle T (August 2013). "Pharmaceutical product impurities: considering beta glucans". American Pharmaceutical Review. 16 (5 Supplement S1): 16–19.
10. Williams KL, ed. (2007). Endotoxins pyrogens, LAL testing and depyrogenation (3rd ed.). New York: Informa Healthcare. p. 342. ISBN 978-1420020595. Retrieved 7 March 2015. Proper endotoxin recovery must be proven before LAL can be used to release product.

11. Gorman, Richard (2020). "Atlantic Horseshoe Crabs and Endotoxin Testing: Perspectives on Alternatives, Sustainable Methods, and the 3Rs (Replacement, Reduction, and Refinement)". Frontiers in Marine Science. 7. doi:10.3389/fmars.2020.582132. ISSN 2296-7745.
12. Jump up to: Maloney T, Phelan R, Simmons N (October 2018). "Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection". PLOS Biology. 16 (10): e2006607. doi:10.1371/journal.pbio.2006607. PMC 6200278. PMID 30312293.
13. https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notices/1085-1-pf-comments-20201211.
14. "Alternative Endotoxin Testing Methods". www.horseshoecrab.org.
15. "Monocyte Activation Test: From Validation to GMP Lab testing". American Pharmaceutical Review.
16. "Elimination of negative feedback in TLR signalling allows rapid and hypersensitive detection of microbial contaminants". Nature Scientific Reports.