مقایسه حساسیت و خصوصیات روش‌های LAL، TOC و پایروژن تست خرگوش با رقت‌های مختلف E.coli برای ارزیابی کیفیت آب WFI در صنایع داروسازی

پریسا بیگدلی[1]، عزت نوری‌زاده[2]×

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۰۲/۰۵ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۶/۰۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه فرآورده‌های تزریقی از جایگاه ویژه‌ای در درمان بیماری‌ها برخوردار هستند و ازآنجاکه سرم‌های تزریقی در ارتباط مستقیم با بدن می‌باشند می‌بایست عاری از پیروژن باشند. با توجه به موارد مذکور هدف از این تحقیق علمی پژوهشی ارزیابی کیفیت آبWFI در صنایع داروسازی توسط روش‌های LAL۴، TOC تست پایروژن خرگوش با رقت‌های مختلف E.coli است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پژوهشی که در کارخانه داروسازی آرتاسرم و آزمایشگاه دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد به مقایسه روش‌های مختلف برای ارزیابی کیفیت آب WFI در صنایع داروسازی پرداخته شد و از موادی نظیر کیت LAL،EMB و دستگاه‌های کلنی کانتر،TOC، بن ماری، اسپکتروفتومترو و خرگوش، باکتری اشرشیاکلی...استفاده شده است.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست‌های خرگوش نشان داد که برای سنجش مقدار اندوتوکسین در آب WFI مناسب نیست هرچند دمای بدن تمامی خرگوش‌ها افزایش داشته است اما به‌جز یک مورد اختلاف معناداری باهم ندارند. نتایج به‌دست‌آمده از تست‌های LAL که در ۱۰ نمونه بررسی شد، بدین ترتیب بوده که در رقیق‌ترین نمونه‌ی محلول مورد آزمایش (رقت 10^{-10}) نتوانست وجود اندوتوکسین را نمایان کند درواقع این تست نیز قادر به نمایان کردن مقدار کم آندوتوکسین نیست. دستگاه TOC توانایی اندازه‌گیری حتی کمترین مقدار آندوتوکسین را دارد (در کمترین رقت مورداستفاده شده تعداد کربن $\frac{\mu g}{l}$ ۲۲۷۲۰ است) از مزایای این روش رسم نمودار توسط خود سیستم می‌باشد همچنین مقدار دقیق آندوتوکسین را مشخص می‌کند درحالی‌که در دو روش قبلی تنها وجود و عدم وجود آندوتوکسین موردبررسی قرار می‌گیرد.

بحث و نتیجه‌گیری: هیچ‌کدام از محلول‌های رقت سازی شده از باکتری E.coli شرایط استفاده برای آب دارویی را نداشتند. همچنین تست LAL نتایج دقیق‌تری نسبت به تست خرگوش داشت، اما تست LAL نیز کاملاً دقیق نمی‌باشد. نتایج نشان می‌دهد همه روش‌ها دارای معایب و محاسنی نسبت به یکدیگر دارند اما استفاده از دستگاه TOC نتایج قابل‌قبول‌تری ارائه می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: LAL، TOC، پیروژن، E.coli، WFI

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره پنجم، ص ۳۵۳-۳۴۲، مرداد ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، تلفن: ۰۹۱۴۴۵۴۳۴۸۱

Email: nourizade@ ut.ac.ir

مقدمه

امروزه با پیشرفت صنایع داروسازی و سرم‌سازی نقش فرآورده‌های تزریقی برکسی پوشیده نیست. ماده اصلی سازنده‌ی سرم‌ها آب می‌باشد لذا کسب اطمینان از موردپسند بودن آب مصرفی در این صنایع از درجه اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اندوتوکسین که با نام لیپوپلی ساکارید (LPS) نیز شناخته می‌شود، اصلی‌ترین ماده تشکیل‌دهنده دیواره سلولی بیرونی باکتری‌های گرم منفی است که می‌تواند پس از تخریب دیواره سلولی باکتری آزاد شود. اندوتوکسین می‌تواند با گیرنده‌های خاص بر روی سلول‌های ایمنی ارتباط برقرار کند و بیان بیش‌ازحد طیف گسترده‌ای از واسطه‌های ایمنی، ازجمله سیتوکین‌های التهابی، اکسید نیتریک و ایکوزانوئیدها را القا کند. درنتیجه، پاسخ‌های حاد ایمنی ممکن است توسط سطح اندوتوکسین در سطح مشخصی ایجاد شود (۱). تست‌های LAL، TOC و پیروژن خرگوش روش‌های سنتی برای مطالعه آلودگی به

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی فیزیولوژی حیوانات، گروه زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

[2] دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

اندوتوکسین است. هر سه آزمایش دارای سابقه طولانی در استفاده از داروهای سنتی و وسایل پزشکی بوده و به‌طورمعمول در تولید دارو مورداستفاده قرار می‌گیرند ازاین‌رو سرعت و دقت روش‌ها جهت تمایز از یکدیگر دارای اهمیت می‌باشد (۴،۳،۲). در سال ۸۲ رفیعی در مطالعه خود به بررسی کارایی تست LAL به روش Gel-clot جهت تشخیص آندوتوکسین باکتریایی در نمونه‌های تزریقی پرداخت. او نشان داد که روش LAL (Gel-clot) به علت ارزانی، سادگی و حساسیت بالا در داروهایی که فاقد اثرات مهاری و تشدیدی هستند یا این اثرات در آن‌ها قابل‌حذف می‌باشد مناسب بوده ولی در مورد داروهایی که به دلیل عدم امکان کنترل اثر مهاری و تشدیدی نمونه (ناشی از یون‌ها، پروتئین‌ها و ... موجود در دارو) که موجب ایجاد نتایج مثبت و منفی کاذب می‌گردد و نیز عوامل تب‌زای غیر اندوتوکسینی نیاز به بررسی بیشتری دارد (۵). در سال ۸۴ قاسمیان و همکارانش در مطالعه‌ای به اندازه‌گیری سطح اندوتوکسین خون در بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتری‌های گرم منفی به روش LAL-test پرداختند. آنان نشان دادند که روش LAL-test در زمانی کمتر از دو ساعت جواب داده و نتایج به سرعت توسط پزشک قابل‌دسترس می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک روش سریع و قابل‌اعتماد در شناسایی بیماران مبتلا به باکتریمی ناشی از باکتری‌های گرم منفی به کار رود. ولیکن باید در نظر گرفته شود که این تست بسیار حساس می‌باشد و در صورتی می‌توان با اطمینان کامل آن را جایگزین کشت خون نمود که تمام مراحل انجام آزمایش در شرایط کاملاً استریل و عاری از اندوتوکسین انجام پذیرد (۶). در سال ۹۵ قراچه به ارزیابی کیفیت آب مصرفی در صنایع داروسازی ازنظر ضوابط میزان کل مواد آلی پرداخت. وی گزارش نمود که به‌منظور سنجش سطح کل مواد آلی در غلظت‌های اندک پیشنهادی برای آب مورداستفاده در صنایع دارویی، آزمون کل کربن آلی (TOC) به دلیل دقت بالا و سرعت و هزینه مناسب یکی از پرکاربردترین گزینه‌ها به شمار می‌رود بااین‌حال اطمینان از کیفیت آب‌های مذکور و انجام یک رده‌بندی معتبر منوط به بررسی دیگر پارامترهای حائز اهمیت مانند: مقدار کل جامدات محلول، PH، اندوتوکسین و EC و ... می‌باشد (۳). در سال ۲۰۰۵ پارک و همکارانش در مطالعه خود به سنجش اندوتوکسین‌های واکسن هپاتیت B دارای هیدروکسید آلومینیوم به دو روش تست پایروژن خرگوش و تست LAL پرداختند. آنان در مطالعه خود از هیدروکسید آلومینیوم به‌عنوان ادجوانت[1] در واکسن هپاتیت B استفاده کردند. نتایج نشان داد که سنجش LPS توسط هر دو تست پایروژن خرگوش و تست LAL تحت تأثیر هیدروکسید آلومینیوم قرار نگرفته است. بااین‌حال تست LAL در تشخیص اندوتوکسین دارای عملکرد بسیار حساس و دقیق‌تری نسبت به تست پایروژن خرگوش را از خود نشان داد (۷). در سال ۲۰۱۰ محنان و همکارانش در مطالعه‌ای با هدف شناسایی پیروژنیکی پنج ماده پلیمری ژلاتین گرید پزشکی برای ساخت کپسول به‌منظور مصارف دارویی، با استفاده از روش‌های ELISA و پیروژن خرگوش گزارش نمودند که روش ELISA دارای حساسیت بسیار بالایی است (۸). در این مطالعه پژوهشی به مقایسه حساسیت و خصوصیت آزمایشات LAL، TOC و پیروژن تست خرگوش با رقت‌های مختلف E,coli برای ارزیابی کیفیت آب WFI در صنایع داروسازی پرداخته شد.

مواد و روش کار

این مقاله پژوهشی منتج از پایان‌نامه با شماره رهگیری ۲۶۲۹۰۴۶ با حمایت مالی و معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی و کد اخلاق (86/609/EC) است، باکتری E.Coli سویه‌ی DH5α مطابق با دستورالعمل، در محیط کشت (Eosin EMB (methylene blue به‌صورت خطی کشت داده شد تا کلنی‌های منفرد جداسازی شوند. به خاطر اطمینان از خالص بودن باکتری از دو روش جلای سبز فلزی حاصل از رشد باکتری بر روی محیط کشت EMB و رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد.

در آزمایش‌ها معمولاً برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری از استاندارد نیم مک فارلند به‌عنوان مرجع استفاده می‌شود (۹). اما در این مطالعه مقدار کدورت سوسپانسیون ایجادشده کمتر از نیم مک فارلند در نظر گرفته شد تا مقدار باکتری کمتر باشد و روش‌های موردبررسی با دقت بالاتری مقایسه شوند. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری به‌وسیله سوآپ استریل چند کلنی به لوله‌ی حاوی آب WFI و لوله‌ی حاوی سرم فیزیولوژیک استریل منتقل شد و پس از مخلوط شدن سوسپانسون در دستگاه vortex mixer، کدورت حاصله در مقابل شعله چراغ گازی مقایسه شد به‌طوری‌که کدورت هر دو یکی شود و کمتر از کدورت نیم مک فارلند شود. پس از استریل کردن و نام‌گذاری ۱۰ عدد لوله آزمایش در بسته حاوی ۹ml آب WFI و ۱۰ عدد لوله حاوی سرم فیزیولوژیک، با استفاده از سمپلر، از نمونه اولیه ۱ml مایع برداشته و به لوله شماره ۱ منتقل شد. بعد از یکنواخت شدن نمونه حاوی رقت 10^{-1}، ۱ml از آن در شرایط استریل به لوله‌ی بعدی انتقال داده شد. مرحله‌ی قبل به ترتیب برای لوله‌های بعدی

[1] ادجوانت ها، ترکیبات شیمیایی یا بیولوژیکی هستند که باعث تحریک غیر اختصاصی سیستم ایمنی، علیه آنتی ژن یا آنتی ژن‌هایی می‌شوند که به همراه آن تزریق شده است.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

نیز تکرار شد تا رقت 10^{-10} به‌دست آید. رنگ کمرنگ‌تر نشان‌دهنده‌ی رقیق‌تر شدن سوسپانسیون اولیه بود. همین مراحل با سرم فیزیولوژیک نیز تکرار شد تا با روش سریالی ۱۰ رقت متفاوت از باکتری E.Coli به‌دست آید. سپس برای اطمینان از درستی رقت سازی سریالی، نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شدند و میزان جذب نور در چهار طول‌موج مختلف اعم از ۴۲۰، ۵۲۰، ۴۸۰ و ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی روش کشت باکتری-ها با رقت‌های مختلف معمولی‌ترین روش شمارش باکتری‌ها کشت دادن حجم خاصی از سوسپانسیون آن‌ها روی محیط کشت و شمارش کلنی‌ها است. در شرایط استریل حدود ۳ لوپ از سوسپانسیون حاوی سرم فیزیولوژیک باکتری E.coli را بر روی محیط کشت EMB کشت داده شد. پس از سپری شدن زمان لازم برای رشد باکتری‌ها، با استفاده از دستگاه کلنی کانتر، کلنی‌ها شمارش شدند.

در شمارش کلنی باکتری‌ها اگر هر ۱ml را معادل ۲۰ قطره از باکتری بدانیم و هر لوپ برابر $\frac{1}{3}$ قطره از باکتری باشد پس تعداد باکتری‌های موجود در ۱ml از سوسپانسیون باکتری استفاده شده قابل‌محاسبه می‌شود.

$$\text{تعداد باکتری ها } 1ml \text{ سوسپانسیون} = \frac{\text{تعداد کلنی} \times 20}{\frac{1}{3}} \quad (۱)$$

برای از بین بردن باکتری و تهیه LPS از روش‌های قرار دادن در حمام آب و دستگاه اولتراسونیک استفاده شد. ابتدا به مدت ۶۰ دقیقه لوله‌های آزمایش حاوی سوسپانسیون (باکتری و آب WFI) در حمام آب با درجه ۸۰ °C قرار داده شد سپس به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند. این فعالیت هر روز دو بار تکرار شد تا درنهایت باکتری از بین برود و تنها LPS باکتری باقی بماند (۱۰). سپس لوله‌های آزمایش در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفتند. هر لوله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب دستگاه اولتراسونیک در نقاطی که حفره‌های آب ایجاد شده بود نگه داشته شدند تا در اثر گرما LPS از باکتری کشته شده جدا شود. پس از تهیه LPS از باکتری نمونه‌ها را با سه روش مختلف تست TOC و تست LAL و تست پیروژن خرگوش سنجیده شد.

آزمایش TOC با استفاده از دستگاه موجود در کارخانه آرتا سرم تحت شرایط فشار داخل در حدود ۱۳۰ بار و فشار خروجی ۲/۵ بار انجام شد. بر اساس کاتالوگ دستگاه باید ml ۱۰۰ از نمونه را با cc ۱ از اسید HCL ۰/۱ نرمال مخلوط کرد. اما چون مقدار نمونه موجود کم بود با دقت ۰/۰۰۱ این کار انجام شد. بدین‌صورت که ml ۹۹ آب WFI را با استوانه مدرج اندازه‌گیری کرده و داخل بالن ریخته سپس با استفاده از سمپلر ml ۱ و سرسمپلر که قبلاً استریل شده بودند ml ۱ از نمونه موجود در لوله 10^{-1} به بالن ژوژه اضافه شد. سپس ml ۱ اسید نیز به آن اضافه شد و پس از ترکیب آن‌ها با استفاده از محلول آب و اسید تیغه‌های دستگاه را شستشو داده و پس از خشک‌کردن داخل محلول قرار داده شد. اکسیژن از طریق یکی از تیغه‌ها از طریق کپسول اکسیژن با مشخصات z.Air 99.9922 mol که به دستگاه متصل است وارد محلول شده و سپس ترکیب با اسید داخل محلول کربن‌های فرار که از مولکول‌های ریزودرشت ایجاد شده داخل دستگاه در کوره و در دمای ۸۰۰°C سوزانده شد. دستگاه ۳ بار میزان کربن را اندازه‌گیری کرده و نمودار مربوطه را رسم می‌کند و یک مقدار میانگین تعیین می‌کند. در آب تزریقی WFI این مقدار باید کمتر از ۵۰۰µ g per litr باشد. این کار برای هر ۱۰ رقت و یک بار نیز با آب WFI به‌عنوان شاهد تکرار شد.

برای انجام تست LAL از کیت‌های لونزا ساخت آمریکا استفاده شد. 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 آمیبوسی‌های 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 قابل‌استفاده می‌باشد (۲). این کیت‌ها علاوه بر آمپول‌های معرف LAL شامل کیت‌هایی حاوی اندوتوکسین بودند که به‌عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود. اگر ml۰/۱ از این نمونه را در آمپول معرف LAL ریخته و در دمای ۳۷°C در حمام آب قرار داده شود پس از گذشت ۶۰ دقیقه با سرو ته کردن نمونه مشاهده می‌شود که مایع ته ویال به حالت ژلاتینی تبدیل شده است که درستی عملکرد کیت‌ها را تأیید می‌کند. درحالی‌که اگر همین آزمایش با ml۱ /۰ آب بدون پیروژن تکرار شود به خاطر عدم وجود اندوتوکسین هیچ ژلی تشکیل نمی‌شود. ازآنجایی‌که مقدار pH نمونه‌ها درنتیجه آزمایش تأثیرگذار است، قبل از آزمایش pH نمونه‌های مورد آزمایش با کاغذ pH سنج اندازه‌گیری شد که در دامنه مجاز (۸-۵/۸) تنظیم شد (۱۱، ۱۴). سپس این آزمایش باml ۰/۱ از هر ۱۰ نمونه تکرار شد.

برای انجام تست پیروژن خرگوش از خرگوش‌های سالم بالغ و نر از یک نژاد با وزن حدودی ۱۵۰۰-۲۰۰۰ گرم استفاده شد. ۱۱ خرگوش در قفسه‌های جداگانه قرار داده شدند، حدود یک هفته در شرایط جدید در دمای یکسان نگهداری شدند تا خود را با شرایط تغییر یافته تطبیق دهند. یک خرگوش به‌عنوان شاهد انتخاب شد و هیچ تزریقی به آن صورت نگرفت، سایر خرگوش‌ها با شماره‌های ۱ تا ۱۰ نشانه‌گذاری شدند. پس‌ازآن به مدت ۴ روز دمای آن‌ها اندازه-گیری شد به این صورت که دماسنج را در رکتوم آن‌ها قرار داده شد

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

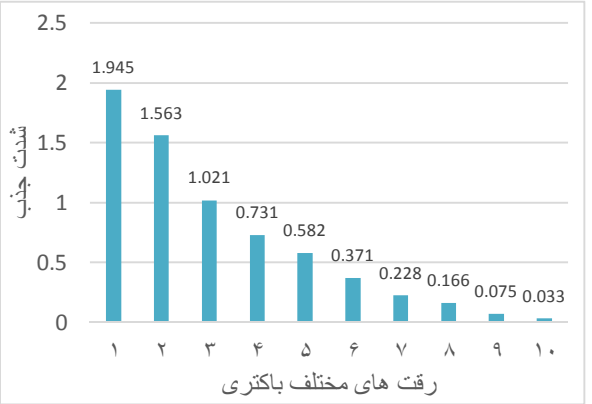
تا دما ثابت شود. در تمام مدت اندازه‌گیری از هرگونه عملی که موجب تحریک و اضطراب جانور می‌شود اجتناب گردید. در روز پنجم کار تزریق جانور آغاز شد بدین‌صورت که به ازای هر کیلوگرم از وزن خرگوش ml ۱ از محلول در شرایط استریل با سرنگ انسولین به داخل ورید ماژینال گوش خرگوش تزریق شد. بعد از یک ساعت از پایان آزمایش به مدت ۳ ساعت، هر ساعت دمای خرگوش اندازه‌گیری و به مدت ۴ روز هر روز دمای آن‌ها سه مرتبه اندازه‌گیری شد (۹، ۱۲).

یافته‌ها

به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر از غلظت‌های هر یک از سوسپانسیون‌های مورد آزمایش در چهار طول‌موج متفاوت ۴۲۰، ۴۸۰، ۵۲۰ و ۵۴۰ نانومتر سنجیده شد. مشاهده شد که ماکزیمم طول‌موج ۴۸۰nm می‌باشد که نتایج آزمایش در جدول (۱) ارائه شده است. همچنین پاسخ دستگاه اسپکتروفوتومتر در برابر غلظت‌های مختلف باکتری در شکل (۱) نشان ارائه شده است. نشان‌دهنده این است که هرچقدر که رقت باکتری در سوسپانسیون کمتر شده شدت جذب دستگاه اسپکتروفوتومتر نیز کاهش یافته است و این اطمینان را حاصل می‌کند که تعداد باکتری‌ها در رقت $۱۰^{-۱}$ بیشتر از همه و در رقت $۱۰^{-۱}$ ۰ کمتر از همه می‌باشد. ازاین‌رو می‌توان دریافت که روش رقت سازی مورداستفاده در این آزمایش درست بوده است و تعداد باکتری‌ها از رقت بالاتر تا رقت پایین‌تر سیر نزولی دارد.

جدول (۱): مقادیر حاصل از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۴۸۰nm

شماره	رقت مورد آزمایش	مقدار جذب
۱	$۱۰^{-۱}$	۱/۹۴۵
۲	$۱۰^{-۲}$	۱/۵۶۳
۳	$۱۰^{-۳}$	۱/۰۲۱
۴	$۱۰^{-۴}$	۰/۷۳۱
۵	$۱۰^{-۵}$	۰/۵۸۲
۶	$۱۰^{-۶}$	۰/۳۷۱
۷	$۱۰^{-۷}$	۰/۲۲۸
۸	$۱۰^{-۸}$	۰/۱۶۶
۹	$۱۰^{-۹}$	۰/۰۷۵
۱۰	$۱۰^{-۱۰}$	۰/۰۳۳



شکل (۱): پاسخ دستگاه اسپکتروفوتومتر در برابر غلظت‌های مختلف باکتری

تعداد کلنی‌های رشد کرده در رقت‌های مختلف باکتری و تعداد باکتری‌ها در ml۱ از رقت‌های مختلف به ترتیب در جداول (۲) و (۳) نشان داده شده است. همچنین تعداد باکتری‌ها در ml۱ از سوسپانسیون در شکل (۲) ارائه شده است. بر اساس جدول (۲) می‌توان بیان کرد که هرچقدر سوسپانسیون غلیظ‌تر باشد تعداد کلونی بیشتری از باکتری در محیط EMB رشد می‌کند. اما در محیط کشت حاصل از رشد باکتری‌های لوله دهم هم تعداد کمی کلنی رشد کرده که بیانگر این است که تعداد باکتری‌ها در لوله دهم صفر نبوده است. همچنین شکل (۱) نشان‌دهنده‌ی این است که حتی در پایین‌ترین رقت که می‌باشد نیز تعدادی باکتری وجود دارد.

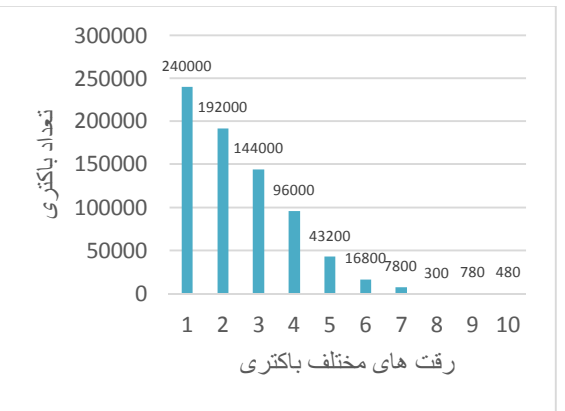
جدول (۲): جدول تعداد کلنی‌های رشد کرده در رقت‌های مختلف باکتری

شماره	رقت باکتری کشت داده شده	تعداد کلنی
۱	$۱۰^{-۱}$	۴۰۰۰
۲	$۱۰^{-۲}$	۳۲۰۰
۳	$۱۰^{-۳}$	۲۴۰۰
۴	$۱۰^{-۴}$	۱۶۰۰
۵	$۱۰^{-۵}$	۷۲۰
۶	$۱۰^{-۶}$	۲۸۰
۷	$۱۰^{-۷}$	۱۳۰
۸	$۱۰^{-۸}$	۵۰
۹	$۱۰^{-۹}$	۱۳
۱۰	$۱۰^{-۱۰}$	۸

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

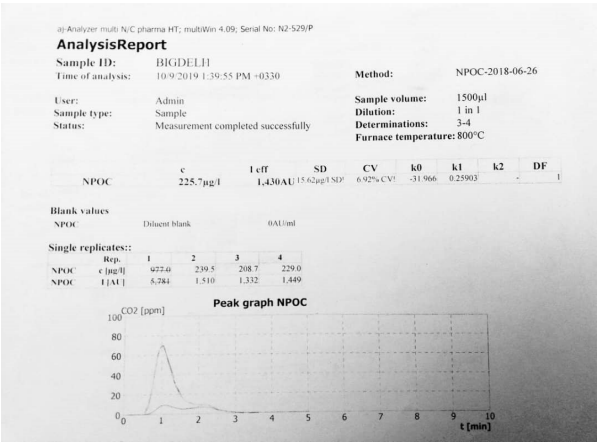
جدول (۳): تعداد باکتری‌ها در ۱ml از رقت‌های مختلف

شماره	رقت‌های مختلف باکتری	تعداد باکتری
۱	$۱۰^{-۱}$	۲۴۰۰۰۰
۲	$۱۰^{-۲}$	۱۹۲۰۰۰
۳	$۱۰^{-۳}$	۱۴۴۰۰۰
۴	$۱۰^{-۴}$	۹۶۰۰۰
۵	$۱۰^{-۵}$	۴۳۲۰۰
۶	$۱۰^{-۶}$	۱۶۸۰۰
۷	$۱۰^{-۷}$	۷۸۰۰
۸	$۱۰^{-۸}$	۳۰۰
۹	$۱۰^{-۹}$	۷۸۰
۱۰	$۱۰^{-۱۰}$	۴۸۰

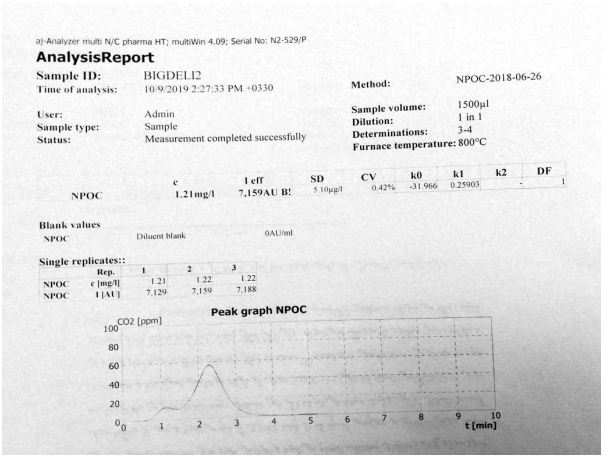


شکل (۲): تعداد باکتری‌ها در ۱ml از سوسپانسیون

منحنی مقدار کربن آلی در نمونه شاهد و نمونه‌های با رقت $۱۰^{-۱}$ به ترتیب در اشکال (۶ و ۷) نشان داده شده‌اند. تمامی آزمایشات TOC برای اطمینان بیشتر دو بار تکرار شدند. به دلیل آنکه مقدار ۰/۰۱ از سوسپانسیون در آزمایش TOC استفاده شد، لذا مقدار کربن آلی به‌دست‌آمده نیز ۰/۰۱ مقدار واقعی است که مقدار واقعی در جدول ۴ ارائه شده است. همچنین نمودار مقایسه مقدار کربن آلی موجود در رقت‌های مختلف از باکتری در شکل (۴) ارائه شده است. برای اینکه آبی برای استفاده در داروسازی مناسب باشد باید مقدار کربن آلی در آن حداکثر $\frac{\mu g}{l}$ ۵۰۰ باشد، اما نمودار نشان می‌دهد در کمترین رقت مورداستفاده شده تعداد کربن در هر لیتر $۲۲۷۲۰\frac{\mu g}{l}$ است، پس قابل‌استفاده نیست و دستگاه توانایی اندازه‌گیری کمترین مقدار باکتری موجود در محلول مورد آزمایش را دارد.



شکل (۳): منحنی مقدار کربن آلی در آب WFI(شاهد)

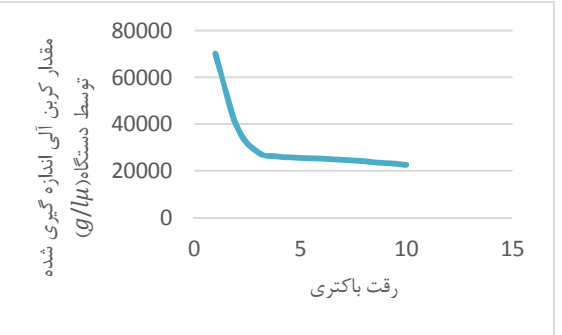


شکل (۴): منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت $۱۰^{-۱}$

جدول (۴): مقدار کربن آلی موجود در رقت‌های مختلف باکتری

شماره	رقت‌های مختلف باکتری	مقدار کربن آلی اندازه‌گیری شده توسط دستگاه ($\frac{\mu g}{l}$)
۱	$۱۰^{-۱}$	۷۰۳۲۰
۲	$۱۰^{-۲}$	۳۹۳۰۰
۳	$۱۰^{-۳}$	۲۸۰۸۰
۴	$۱۰^{-۴}$	۲۶۲۷۰
۵	$۱۰^{-۵}$	۲۵۸۴۰
۶	$۱۰^{-۶}$	۲۵۴۳۰
۷	$۱۰^{-۷}$	۲۴۹۹۰
۸	$۱۰^{-۸}$	۲۴۲۴۰
۹	$۱۰^{-۹}$	۲۳۵۸۰
۱۰	$۱۰^{-۱۰}$	۲۲۷۲۰

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]



شکل (۵): نمودار مقایسه مقدار کربن آلی موجود در رقابت‌های مختلف از باکتری

در این مطالعه آزمایش تست LAL دو بار تکرار شد که شامل یک تست مقدماتی و یک سری تست ثانویه جهت حصول اطمینان از صحت نتایج حاصله از تست مقدماتی بود که نتایج آن در جدول (۵) ارائه شده است. طبق مندرجات دستورالعمل کارخانه سازنده معرف پس از خارج نمودن آمپول‌ها از انکوباتور ۳۷°C و قرار دادن در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه هر یک از آمپول‌ها برای مشاهده نتیجه حاصله به زاویه ۴۵ درجه منحرف گردید، درصورتی‌که ژل سخت تشکیل شده باشد به‌طوری‌که شکل آن حتی با منحرف نمودن آمپول هم تغییر نکند این حالت نشان‌دهنده وجود آندوتوکسین می‌باشد که در جدول (۵) با علامت (+) نشان داده شده است.

جدول (۵): نتایج تست LAL

شماره	رقت‌های باکتری مورداستفاده در آزمایش	نتایج تست LAL
۱	10^{-1}	+
۲	10^{-2}	+
۳	10^{-3}	+
۴	10^{-4}	+
۵	10^{-5}	+
۶	10^{-6}	+
۷	10^{-7}	+
۸	10^{-8}	+
۹	10^{-9}	±
۱۰	10^{-10}	-

اگر هیچ تغییری در مایع در مقایسه با شکل اولیه آن حاصل نشده باشد یعنی اندوتوکسین وجود نداشته است و یا به‌قدری کم می‌باشد که آمپول LAL توانایی تشخیص آن را ندارد که در جدول با علامت (-) نشان داده شده است. اگر ژل ناهموار به‌صورت دانه‌دانه تشکیل شود ویسکوزیته آن به‌وضوح بالا رفته است و اندوتوکسین در محلول کم می‌باشد که با علامت (±) نشان داده شده است. در رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} واکنش تشکیل ژل انجام شده است که نشان‌دهنده وجود اندوتوکسین در این محلول‌ها می‌باشد که با آمبوسیت‌ها واکنش داده و تشکیل ژل صورت گرفته است (شکل ۶). اما در آمپول‌های حاوی ۰/۱ml از رقت 10^{-10} تشکیل ژل صورت نگرفته است و محتویات آمپول بدون تغییر باقی مانده‌اند (شکل ۷). در آمپول‌هایی که رقت‌های 10^{-9} استفاده شده است، مقدار خیلی کمی باکتری وجود داشته زیرا باکتری به حدی نبوده است تا تشکیل ژل سخت صورت بگیرد، اما مقداری آندوتوکسین باکتری وجود داشته تا ویسکوزیته محلول را تغییر دهد و افزایش ویسکوزیته حاصل شود (شکل ۸).

شکل (۶): تشکیل ژل در آمپول حاوی ۰/۱ml از رقت 10^{-1} باکتری (+)

شکل (۷): عدم تشکیل ژل در آمپول حاوی ۰/۱ml از رقت 10^{-10} باکتری (-)

شکل (۸): محتویات آمپول با ویسکوزیته بالا در ۰/۱ml از رقت 10^{-9} باکتری (±)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

پس از انجام تست خرگوش تمامی دماهای یادداشت شده و پس از میانگین ۴ دمای قبل از آزمایش و ۶ درجه حرارت ثبت‌شده پس از تزریق برای هر گوش محاسبه شد. سپس با درجه حرارت قبلی مربوط به همان خرگوش مقایسه شد که نتایج حاصله به‌طور جداگانه در جدول (۶) آورده شده است. طبق دستورالعمل مندرج در USP(United States PHarmacopeia) اگر اختلاف دمای قبل و بعد از تزریق از ۰/۶ درجه سانتی‌گراد بیشتر باشد خرگوش به تست پیروژن پاسخ + داده است که در رقت‌های تهیه‌شده در آندوتوکسین فقط در یک مورد دیده شد. البته باید گفت که در اکثر موارد در مورد بالاترین غلظت آندوتوکسین میزان افزایش درجه حرارت خرگوش‌ها در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر آندوتوکسین بیشتر بوده، اما به‌هرحال فقط ۰/۶ درجه سانتی‌گراد تغییر در غلظت مشاهده شد.

جدول (۶): نتایج حاصل از روش تزریق آندوتوکسین به خرگوش

شماره خرگوش	وزن پیش از تزریق (g)	مقدار محلول تزریق‌شده (ml)	میانگین درجه حرارت قبل از تزریق (°C)	میانگین درجه حرارت بعد از تزریق (°C)	اختلاف درجه پیش و پس از تزریق (°C)
۱	۱۸۰۰	۱۸	۳۷/۹	۳۸/۷	۰/۸
۲	۱۷۰۰	۱۷	۳۷/۵	۳۸	۰/۵
۳	۱۵۰۰	۱۵	۳۷/۷	۳۷/۸	۰/۱
۴	۱۸۵۰	۱۸/۵	۳۷/۹	۳۸/۴	۰/۵
۵	۱۶۰۰	۱۶	۳۸/۲	۳۸/۵	۰/۳
۶	۱۵۰۰	۱۵	۳۷/۸	۳۸	۰/۲
۷	۱۷۰۰	۱۷	۳۸	۳۸/۴	۰/۴
۸	۲۰۰۰	۲۰	۳۷/۵	۳۸/۱	۰/۶
۹	۱۵۰۰	۱۵	۳۷/۵	۳۷/۹	۰/۴
۱۰	۱۹۰۰	۱۹	۳۷/۹	۳۸/۱	۰/۵

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصله از تست‌های خرگوش انجام شده نشان داد که واکنش افزایش دمای بدن خرگوش در مقابل تزریق محلول‌های حاوی رقت‌های مختلف آندوتوکسین یکسان نبوده ولی به‌جز یک مورد که در خرگوش اول که از آندوتوکسین محلول رقت 10^{-1} به آن تزریق شد این افزایش حرارت پایین‌تر از ۶°C بوده و می‌توان بیان کرد که اختلاف معناداری بین دمای بدن خرگوش‌های ۲- ۳- ۴- ۵- ۶- ۷- ۸- ۹- ۱۰ نبوده و تنها خرگوش شماره ۱ دارای اختلاف معنادار با سایر خرگوش‌ها می‌باشد و با توجه به آزمایش‌های قبلی اعم از نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتر یا رشد باکتری‌ها در محیط کشت EMB از وجود باکتری در تمام رقت‌ها اطمینان حاصل شد بنابراین تست خرگوش توانایی نشان دادن آندوتوکسین فقط در یک مورد را نشان داده و این تست برای سنجش مقدار آندوتوکسین در آب WFI مناسب نمی‌باشد.

علاوه بر این مشکلاتی اعم از تغییرات شرایط فیزیولوژیی بدن خرگوش‌ها و تغییر شرایط آزمایشگاهی بر نتایج آزمایش تأثیر می‌گذارد، احتمال خطا را افزایش می‌دهد اما بااین‌حال این روش نسبت به دو روش دیگر ازلحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه‌تر می‌باشد.

نتایج به‌دست‌آمده از تست‌های LAL انجام شده بدین ترتیب بوده است که در آمپول‌های حاوی ۱ میلی‌لیتر رقت‌های از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} از آندوتوکسین پاسخ به‌صورت ژل سخت نمایان شده که وجود قطعی آندوتوکسین را نشان می‌دهند و در آمپول‌های حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت 10^{-9} آندوتوکسین پاسخ به‌صورت ژل نرم و پیدایش ویسکوزیته بالا نمایان شده بود که احتمال وجود آندوتوکسین را نشان می‌دهد و در آمپول‌های حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت 10^{-10} آندوتوکسین محلول به‌صورت روان مشاهده‌شده که می‌توان نتیجه گرفته تست LAL تا حدود زیادی توان نشان دادن پیروژن موجود در آب WFI را دارد و این روش نسبت به تست پیروژن خرگوش بسیار کارآمدتر می‌باشد. اما با توجه به اینکه این تست نیز در مورد محلول مورد آزمایش آخر نتوانست وجود آندوتوکسین را نمایان کند و ژل سخت یا روان تشکیل دهد می‌توان بیان کرد که این تست نیز قادر به نمایان کردن مقدار کم آندوتوکسین نمی‌باشد اما احتمال خطای این روش نسبت به روش قبلی کمتر می‌باشد. اما اگر هنگام تهیه یا استخراج مواد مورد آزمایش دقت کافی مبذول نگردد تا احتمال حضور حتی مقادیر ناچیز از آندوتوکسین از بین برود، انتظار می‌رود که تست LAL پاسخ مثبت دهد و آبی که غیر پیروژن بوده به دلیل انجام تست پیروژن مسلط نشده یا استفاده از ابزار و وسایلی که به‌خوبی عاری از پیروژن نگردیده باشد موجب آلودگی در مورد آزمایش به آندوتوکسین شود و نتایج آزمایش را به‌درستی منعکس نکند.

برتری تست LAL بر تست خرگوش امری واضح می‌باشد و پژوهش‌های گسترده‌ای دراین‌باره انجام گرفته است در سال‌های گذشته FDA اعلام کرد که برای فرآورده‌های تزریقی و آنتی‌بیوتیکی و بیولوژیکی انسانی و دامی می‌توان به‌جای تست پیروژن و رسمی خرگوش از تست LAL به‌عنوان تست نهایی فرآورده‌ها استفاده کرد، در کل می‌توان بیان داشت تستLAL برای آزمودن پیروژنسیته فرآورده‌های دارویی و وسایل پزشکی در کشورهای خارجی با استقبال زیادی مواجه بوده است. اما از معایب این روش می‌توان به گران بودن این تست و هم‌چنین در دسترس نبودن آن اشاره کرد، علاوه بر این شرایط نگه‌داری این تست خاص می‌باشد و باید آمپول‌ها در دمای خاصی نگهداری شوند.

با استناد به جدول ۴ دستگاه TOC توانایی اندازه‌گیری حتی کمترین مقدار آندوتوکسین در نمونه‌ها را نیز دارد و مشاهده شد که حتی در کمترین رقت مورداستفاده یعنی نمونه 10^{-10} نیز مقدار

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

زیادی آندوتوکسین وجود دارد که برای استفاده آب دارویی مناسب نمی‌باشد از مزایای این روش رسم نمودار توسط خود سیستم می‌باشد علاوه بر این، این روش نسبت به دو روش قبلی این مزیت را دارا است که این مقدار دقیق آندوتوکسین را مشخص کند درحالی‌که دو روش قبلی تنها وجود و عدم وجود آندوتوکسین را موردبررسی قرار می‌دادند و همین‌طور احتمال خطا در این روش به حداقل می‌رسد، در این روش قابلیت تکرار آزمایش‌ها در سطح بالا وجود دارد. اما شایان‌ذکر است که در انجام این روش حتماً باید ظروف با دقت بالا استریل شود و برای پرهیز از آلودگی‌های کربنی موجود در هوا حتماً درب بالا با استفاده از کاغذ فویل پوشیده شود و در شستشوی تیغه‌های دستگاه دقت لازم مبذول کرد از معایب این روش نسبت به دو روش قبلی می‌توان اشاره کرد که دستگاه TOC مقدار کربن آلی را اندازه می‌گیرد ممکن است این کربن تنها ناشی از کربن موجود در آندوتوکسین نباشد و چراکه سایر ساختارهای باکتری مانند پروتئین‌ها حاوی کربن الی می‌باشد که ممکن است درنتیجه آزمایش تأثیر بگذارد. علاوه بر این، این دستگاه هزینه بسیار زیادی دارد و به‌راحتی قابل‌دسترسی نمی‌باشد و تنها در آزمایشگاه‌های تخصصی کارخانه‌های داروسازی قابل یافت می‌باشد.

تحقیقات مشابه متعددی در این زمینه انجام شده است برای مثال ۱۹ نمونه از فرآورده‌های تزریقی و محلول‌های مورداستفاده در پزشکی و داروسازی در تحقیقی مشابه که توسط آقای جمشیدی در سال ۱۳۶۲ در دانشگاه تهران به‌منظور بررسی حساسیت LAL و آزمایش پیروژن خرگوش USP انجام شد نتایج تقریباً مشابهی حاصل شد (۷). اما در این پژوهش علاوه بر مقایسه روش تست LAL و تست پیروژن خرگوش اثر الکترولیت‌ها بر روی روند واکنش تشکیل ژل در تست LALموردبررسی قرار گرفته است بدین‌صورت که از محلول‌های مورداستفاده در داروسازی و پزشکی مانند: آب مقطر استریل قابل تزریق، محلول تزریقی کلر و سدیم ۰/۹درصد، محلول تزریقی گلوکونات کلسیم ۱۰درصد، محلول تزریقی سولفات منیزیم ۱۰درصد، محلول سولفات سدیم ۳/۸۹درصد، محلول کلرور آلومینیوم ۱/۱۵درصد، محلول تزریقی لاکتات سدیم ۲درصد، محلول سیترات سدیم ۴درصد، محلول فسفات سدیم، محلول تزریقی دکستران آهن، محلول تزریقی ویتامین ث، محلول تزریقی ویتامین B_{12} محلول تزریقی ویتامین ب-کمپلکس، محلول تزریقی بتامتازون، محلول تزریقی دگزا متازون و محلول تزریقی جنتامایسین انتخاب شده و پس از آلوده شدن به آندوتکسین با غلظت‌های معین مورد آزمایش قرار گرفته است. به‌منظور آلوده ساختن محلول‌های مورد آزمایش با غلظت‌های مختلف آندوتوکسین از آمپول‌های حاوی اندوتوکسین که جهت انجام آزمایش کنترل مثبت همراه کیت LAL عرضه می‌گردد استفاده شده است یعنی این پژوهش بر روی اندوتوکسین باکتری خاصی انجام نشده است درحالی‌که در پژوهش ما اختصاصاً بر روی آندوتوکسین باکتری Ecoli کار شده است. قبل از انجام آزمایشLAL بایدpH محلول‌ها را در محدوده قابل‌قبول برای انجام تست LAL تنظیم کردیم که تمام محلول‌های مورد آزمایش در این پژوهش در pH معین یعنی از ۵/۵ تا ۸ قرار داشتند اما چون محلول‌های مورداستفاده در آزمایش آقای جمشیدی از تنوع بالاتری برخوردار بودن در مورد تعدادی از نمونه‌هایی که خارج از محدوده مجاز بودند مانند (ویتامین ب-۱۲، ویتامین ب-کمپلکس، دکستروز ۲۰درصد، کلر و آلومنیوم ۱۵درصد و بتامتازون) با استفاده از محلول‌های تازه تهیه‌شده از سود و اسید کریدریک ۰/۱ نرمال استریل و عاری از پیروژن در دامنه مجاز pH تنظیم گردیده است.

اما نکته حائز اهمیت این است که تمام مواد را نمی‌توان با استفاده از این دو محلول در محدوده مجاز قرار داد برای مثال در مورد محلول تزریقی جنتامایسین به دلیل اینکه بعد از افزودن HCL دز محلول ایجاد کدورت می‌گردد تست LAL بدون تنظیم pH تنظیم‌شده است پس انتظار نمی‌رود نتیجه چندان درستی حاصل گردد. نتایج حاصل از این پژوهش با آنچه از پژوهش ما حاصل گردیده تقریباً مشابه می‌باشد بدین‌صورت که نتایج حاصل از آزمایش‌ها LAL انجام شده بر روی محدوده وسیعی از غلظت‌های آندوتوکسینی بین ۰/۰۰۵ تا ۵۰ واحد آندوتوکسین در هر میلی‌لیتر از محلول‌های مورد آزمایش (معادل ۱ الی ۱۰۰۰۰ بیکو گرم آندوتوکسین در هر میلی‌لیتر) مشخص نمود که حساسیت تست LAL یا به‌عبارتی‌دیگر مرحله ایجاد ژل نرم (پاسخ +) در مورد آب مقطر استریل قابل تزریق به میزان واحد آندوتوکسین در هر میلی‌لیتر از محلول (۵۰ پیکو گرم در میلی‌لیتر) و در مورد جنتامایسین، دکستروز، کورتیکو تروئیدها و ویتامین‌ها به میزان ۰/۵ واحد آندوتوکسین در هر میلی‌لیتر از محلول (۱۰۰ پیکو در میلی‌لیتر) می‌باشد.

روش انجام تست خرگوش مشابه آنچه ما انجام دادیم می‌باشد، بدین‌صورت که آزمایش‌های انجام شده مشخص نمود که آستانه بروز تظاهرات پیروژنیک یا TPD (Threshold Pyrogenic Dose) در مورد نرمال سالین معادل ۱۱/۲۵ واحد آندوتوکسین به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن خرگوش (۲/۲۵ نانوگرم) بود که با یک جهش ناگهانی در درجه حرارت حاصل می‌گردد. با گذاشتن از مرز TPD و ایجاد جهش ناگهانی در دمای بدن خرگوش‌ها، دیگر هیچ‌گونه افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در درجه حرارت مشاهده نمی‌شد. به‌طوری‌که حتی افزایش دمای خرگوش‌ها در حضور غلظت آندوتوکسی ۵۰ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن خرگوش نیز در همان حد TPD بود بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پس از رسیدن به حد TPD، افزایش غلظت آندوتوکسین در محلول تزریقی هیچ‌گونه اثری در افزایش دمای بدن خرگوش‌ها نخواهد داشت. جواب تست در مورد کلیه نمونه‌های مورد آزمایش، در حضور غلظت‌های آندوتوکسینی ۰/۰۰۵، ۰/۰۵، ۰/۵، ۵ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن خرگوش منفی و در حضور غلظت آندوتوکسین ۵۰ واحد به ازای

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

کیلوگرم مثبت بوده و افزایش دما در حد TPD صورت می‌گرفت. پاسخ تست خرگوش در مورد ویتامین‌ها تا حدی با سایر محلول‌های مورد آزمایش متفاوت بود. بدین ترتیب که خرگوش‌ها پس از تزریق غلظت‌های مختلف آندوتوکسین از محلول‌های تزریقی ویتامین ث، ویتامین B_{12} و ویتامین ب-کمپلکس افزایش دمای بیش‌ازحد معمول نشان می‌دادند.

دکتر جمشیدی در بخش نتیجه بیان می‌کند که کمترین غلظت حساس به تست LAL برابر با ۰/۲۵ واحد آندوتوکسین در میلی‌لیتر برای آب مقطر قابل تزریق و ۰/۵ واحد آندوتوکسین در میلی‌لیتر برای سایر محلول‌ها می‌باشد، بدین ترتیب این تست در جهت اثبات حضور آندوتوکسین‌ها در محلول‌های تزریقی به‌مراتب از حساسیت-های بیشتری نسبت به تست خرگوش برخوردار است. تستی که از حساسیت سرعت و دقت عمل بیشتری نسبت به تست خرگوش برخوردار بوده و با صرف هزینه و امکانات کمتری انجام پذیرفته می‌باشد در حال حاضر از سوی مجامع رسمی و بین‌المللی داروسازی ازجمله به‌عنوان روش کنترل در حین ساخت فرآورده‌های تزریقی و کنترل نهایی وسایل مورداستفاده قرارگرفته است و نیز در داروسازی و پزشکی و برخی از فرآورده‌های تزریقی مانند داروهای فرآورده‌های داروهای مخدر ضد سرطان و رادیواکتیو و هم‌چنین فرآورده‌های بیولوژیکی پذیرفته شده است (۹).

همین‌طور در مقاله‌ای که توسط دکتر پرویز ایازی و دکتر محمدمهدی دانشی بر روی مقایسه کاربرد کشت خون و اندازه‌گیری آندوتوکسین در تشخیص عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های گرند منفی انجام شده است بیان می‌گردد که حساسیت آزمایش LAL در این تحقیق ۱۰۰ درصد و ویژگی آن ۹۶ درصد بوده (۱۳) در بررسی که توسط عمادی در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده حساسیت LAL با روش کمی ۱۰۰ درصد و با روش کیفی ۹۶ درصد و ویژگی آن ۹۷ درصد بوده (۱۵).

در کتب مرجع نیز حساسیت و ویژگی آزمایشLAL به ترتیب ۹۳ و ۹۹/۴ درصد گزارش شده است که با تحقیق انجام شده توسط این اساتید هم‌خوانی دارد (۱۶).

از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که از تست‌های LAL نه‌تنها در تهیه آب WFI می‌توان استفاده کرد بلکه به‌منظور مطالعه و مقایسه کشت خون و تشخیص عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم-های گرند منفی نیز استفاده می‌شود. ما همان‌طور که در این پژوهش و پژوهش انجام شده توسط ما گفته شد تست‌های LAL بسیار حساس می‌باشند و در انجام این تست باید تمامی اصول بهداشتی با دقت تمام رعایت گردد.

Richter و همکارانش در یک مقاله منتشرشده در آلمان با عنوان "مقایسه تست LAL و تست پیروژن خرگوش " از بین ۴۶ نمونه مورد آزمایش، دو نمونه در هر دو تست مثبت گزارش شده و پنج نمونه فقط در تست LAL مثبت بوده است. بر اساس نتایج به-دست آمده در این مقاله، Richter و همکارانش عنوان کرده‌اند که تست LAL نمی‌تواند به-عنوان تست جایگزین پیروژن خرگوش در کنترل کیفیت در صنایع پزشکی و داروسازی باشد و این مقاله تنها به حساسیت بالا و دقت زیاد این تست نسبت به تست پیروژن خرگوش پرداخته-اند. (۱۷)

در مطالعه‌ای با عنوان "بررسی سلول‌های مونوسیتوئید انسان به‌عنوان شاخص‌های اندوتوکسین: مقایسه شده توسط تست LAL و تست پیروژن خرگوش" که توسط Simone Eperon و همکارانش انجام گرفته‌شده، به‌وضوح به نقش برجسته و مفید تست LAL در تشخیص LPS و سرعت و دقت بالای این تست نسبت به تست پیروژن خرگوش اشاره شده است. در روش تست پیروژن خرگوش و ثبت دما به‌صورت دستی، همیشه نیاز به حضور تمام‌وقت یک نفر کارشناس آزمایشگاه می‌باشد. در این تست خرگوش بسیار حساس به سروصدای آزمایشگاهی و تحت تأثیر فاکتورهای متغیر محیطی می‌باشد. خطای انسانی نیز در این‌چنین مطالعات بی‌تأثیر نمی‌باشد. (۱۸)

پژوهشی بر مبنای بررسی سطح آندوتوکسین خون بیماران همودیالیزی و مقایسه آن با کشت خون توسط حاجی قاسمیان صفایی، انجام شد، هدف از این تحقیق ارزیابی آزمایش لیمولوس در تعیین آندوتوکسین خون مبتلایان به باکتریمی ناشی از باکتری‌های گرم منفی و نتیجتاً شناسایی سریع باکتریمی بود و با توجه به اینکه بیماران همودیالیزی نیاز به تشخیص و درمان سریع عفونت‌های باکتریایی دارد می‌تواند در صورت به‌دست آوردن ارتباط مناسب با نتایج کشت خون از این آزمایش برای تشخیص استفاده کرد (۵).

در پژوهش دیگری با عنوان ارزیابی کیفیت آب مصرفی بر صنایع داروسازی ازنظر ضوابط میزان کل مواد آلی که در دانشکده داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه تهران توسط سلماز قرابچه انجام شده است در این پژوهش با استفاده از دستگاه TOC آب‌های دارویی ساخته شده توسط کارخانه‌های مختلف را ازنقطه‌نظر غلظت کربن آلی موردبررسی قرار داده است که تمامی نمونه‌ها از شرایط خوبی برخوردار بوده و استانداردهای مربوطه پیروی می‌کردند بااین‌وجود نسبت پیروی از روابط مذکور در هیچ‌کدام از نمونه‌ها یکسان نبوده و اختلاف معناداری بین آب‌های دارویی با برندهای مختلف مشاهده می‌گردید اختلاف موجود بین قرائت‌های مختلف دستگاه برای تکرارهای متناوب مربوط به هرکدام از نمونه‌ها اندک بوده و این تفاوت‌های کم به‌عبارت‌دیگر انحراف معیار کم‌مقدار قرائت‌ها برای تکرارهای مختلف صورت گرفته نشان‌دهنده‌ی دقت بالای آزمایش‌ها است (۶).

از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که شرایط آب دارویی موردمطالعه ازنقطه‌نظر محتوای سطح کربن در محدوده موردقبول واقع گردیده است. یافته‌ها، تحلیل‌ها و مقایسه‌هایی که صورت

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

پذیرفته نشان می‌دهد که سطح پیروی در محصولات تولیدی توسط کارخانه‌های مختلف متفاوت است ریشه برخی تفاوت‌ها را می‌توان در رویه مدیریتی و نحوه راه بردی سیستم‌های تصفیه جستجو کرد. در پژوهش دیگری که توسط مهری سید هشترودی و علی مهدوی نیا در مورد کربن آلی کل انجام شد این پارامتر را یک نشانگر غیراختصاصی از وضعیت آب موجود در محیط‌های طبیعی و صنعتی معرفی می‌کند که اطلاعات کلی در مورد کربن آلی موجود در آب یا رسوب در اختیار محققین قرار می‌دهد. برای اندازه‌گیری آن از دستگاه TOC استفاده می‌شود که از دو روش اکسیداسیون حرارتی و نوری استفاده می‌کند. از مزایای یک دستگاه مناسب، راحتی کار با دستگاه، دقت بالای انداز گیری، محدوده وسیع غلظت‌های مورد انداز گیری، زمان کوتاه آنالیز و نیز هزینه مناسب آن می‌باشد (۱۹). با توجه به مقایسه پژوهش‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت که نتیجه حاصل‌شده از پژوهش ما با سایر پژوهش‌های دیگر هم‌خوانی دارد. درنتیجه دستگاه TOC نتایج دقیق‌تری نسبت به دو روش دیگر ارائه می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه به مقایسه حساسیت و خصوصیت آزمایشات LAL، TOC و پیروژن تست خرگوش با رقت‌های مختلف E,coli برای ارزیابی کیفیت آب WFI در صنایع داروسازی پرداخته شد که طی آن مشخص شد که محلول‌های رقت سازی شده از باکتری E-coli بااینکه مقدار بسیار کمی باکتری داشتند، هیچ‌کدام شرایط استفاده برای آب دارویی را نداشتند و یافته‌های تحقیق و تحلیل‌ها و مقایسه‌های صورت گرفته نشان داد که همه روش‌ها دارای معایب و محاسنی نسبت به یکدیگر هستند اما نتایج حاصل از دستگاه TOC به نظر می‌رسد نسبت به دو روش دیگر دقیق‌تر می‌باشد و تست LAL نیز نسبت به تست پایروژن خرگوش بهتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه محقق اردبیلی بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی که حامی مالی است، سپاسگزاریم.

References:

1. Mehmood Y. What Is Limulus Amebocyte Lysate (LAL) and It's Applicability in Endotoxin Quantification of Pharma Products [Internet]. Growing and Handling of Bacterial Cultures. IntechOpen; 2019 [cited 2021 Sep 14]. Available from: https://www.intechopen.com/chapters/65069
2. Dobrovolskaia MA, Neun BW, Clogston JD. Ambiguities in applying traditional Limulus amebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations. Nanomed J (London, England) 2010; 5(4):555-62.
3. Gharacheh S, Evalution of water quality in pharmaceutical industries in terms of total organic matter criteria. (Dissertation). Islamic Azad University; 2016.
4. Spoladore J, Gimenes L, Bachinski R, Negherbon JP, Hartung T, Granjeiro JM, et al. Standardized pyrogen testing of medical products whis the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit pyrogen testing (RPT). J Toxicol in vitro 2021; 74(4):105-60
5. Rafiee Anarkuli T. Evaluation of the effectiveness of LAL kit by Gel-clot method for the detection of bacterial endotoxin. 6th National Congress of Microbiology of Iran. Tehran; 2003.
6. Ghasemian- Safaii H, Yazdani R, Navid Akbar F, Vazirzadeh GH. Maesurement of endotoxin levels in blood of hemodialysis potients by ‘LaL’ test and comparision of its efficacy with blood culture. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 2006; 13(5) 9-14.
7. Park CY, Jung SH, Bak JP, Lee SS, Rhee DK. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. Int.J.Biol Standard 2005; 33(3):145-51.
8. Mohanan PV, Banerjee S, Geetha CS. Detection of pyrogenicity on medical grade polymer materials using rabbit pyrogen, LAL and ELISA method. J Pharm Biomed Anal 2011; 55(5) : 1170-4.
9. Jamshidi MH. Campovison of sensitivity of LAL test and rabbit pyrogen test and investigatron of the mechanism of inhibitory effect of electrolytes on LAL test. (Dissertation). Faculty of pharmacy: Tehran University; 1987.
10. Ghanbari M R. Changes in interleukin 6 in miss serum after experimental in flammation of chorio amnion

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

using non-pathogenic Escherichia coil bacterial carcasses. (Dissertation). Faculty of Veterinary Medicine: Shahrekord University of Medical Sciences; 2016.

11. Piehler M, Roeder R, Blessing S, Reich J. Comparsion of lal and rFC Assaya-Participation in a proficiency test program between 2014 and 2019. Microorganisms2020; 8(3):418.
12. Moser CP. Understanding the limulus amebocyte lysate and rabbit pyrogen test for low endotoxin recovery studies. Am Pharm Rev2015; 18(6).
13. Ayazi P, Daneshi MM. Compration of blood cultares and endotoxin measurements in diagnosis of gramnegative bacterial in fections. J Qazvin Univ Med Sci 2009;29(7): 25-9.
14. Mitra A, Joshi S, Arjun CH, Kulkarni S, Rajan R. Limulus Amebocyte Lysate Testing :Adabting it for determination of bacterial endotoxin in tc-labeled radiopharmaceuticals at ahospitalradiopharamcy. J Nucl Med technol 2014 ; 42(4) :278-82.
15. Emadi G. The use of immunology metods in rapid diagnosis of bacterial agents in children and infants. (Dissertation). Faculty of medicine: Shahid Beheshti University; 1986.
16. Mandel G L. Principle and practice of infectious diseases. 5th Ed. USA, Churchill Livingstone; 2000. P. 806-7.
17. Richter K, Grahlow WD, Wigert R. Comparison of the Limulus test with the pyrogen test in rabbits. Acta Biol Med Ger 2000; 39(2-3):277-80.
18. Eperon S, DeGroote D, Werner-Felmayer G, Jungi TW. Human monocytoid cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and Limulus amoebocyte lysate assay. J Immunol Methods 207(2):135-45. DOI: 10.1016/ s0022-1759(97)00112-9.
19. Hashtroudi SM, Mahdinia A. An introduction to Total Organic Analyser. [836180].2017; 1(1) Available from URL: Http:// civilica .com /doc.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]

Original Article

COMPARISON OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF LAL/TOC ANIMAL PYROGEN (RABBIT) TEST WITH DIFFERENT DILUTIONS OF E.COLI FOR THE ASSESSMENT OF QUALITY OF WFI IN PHARMACEUTICS

*Parisa Bigdeli[1], Ezzat Nourizade[2]**

Received: 25 April, 2021; Accepted: 25 August, 2021

Abstract

***Background & Aims*:** Today, parenteral products occupy a particular place in the treatment of diseases and human health. Consequently, the presence of any microbial contamination in the water used in the drug production process may have adverse effects on the health of individuals and society. Since parenteral sera are in direct contact with the human body and blood, they must be free from pyrogens. The purpose of this study was to evaluate WFI water quality in the pharmaceuticals industry by LAL test methods and TOC test and rabbit pyrogen test with different dilutions of E. coli.

Materials & Methods: In the present study, the sensitivity and specificity of LOL, TOC, and rabbit pyrogen tests with different dilutions of E. coli were evaluated to assess the water quality of WFI in the pharmaceuticals industry. LAL kits, EMB, TOC set, Spectrometer, Colony counter and Rabbits and… wad used in this study

Results: None of the diluted solutions of E. coli were appropriate for medicinal water. The LAL test also gave more accurate results than the rabbit test, although it still appears that the LAL test is not entirely accurate.

Conclusion: The results showed that all methods have advantages and disadvantages compared to one another, but the use of the TOC device in the thinnest samples demonstrates more acceptable results.

Keywords: LAL, TOC, Pyrogen, E. coli, WFI

Address: Department of Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Tel: +989144543481
Email: nourizade@ ut.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(5): 353 ISSN: 2717-008X

[1] Masters student in the biology of Animal physiology, Department of Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2] Associate professor, Department of Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (Corresponding Author)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-19]