

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

پریسا بیگدلی^۱، عزت نوری‌زاده^۲*

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 از آنجاکه سرم‌های تزریقی در ارتباط مستقیم با بدن می‌باشند می‌بایست عاری از پیروزن باشند. با توجه به موارد مذکور هدف از این تحقیق علمی پژوهشی ارزیابی کیفیت آب WFI در صنایع داروسازی توسط روش‌های LAL، TOC تست پیروزن 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 EMB، LAL و دستگاه‌های کلنی کانتر، TOC، بن ماری، اسپکتروفتومتر و خرگوش، باکتری اشرشیاکلی... استفاده شده است.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست‌های خرگوش نشان داد که برای سنجش مقدار آندوتوکسین در آب WFI مناسب نیست هرچند دمای بدن تمامی خرگوش‌ها افزایش داشته است اما به جز 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 ۱۰^{-۱۰}) نتوانست وجود آندوتوکسین را نمایان کند در واقع این تست نیز قادر به نمایان کردن مقدار کم آندوتوکسین نیست. دستگاه TOC توانایی اندازه‌گیری حتی کمترین مقدار آندوتوکسین را دارد (در کمترین رقت مورد استفاده شده تعداد کربن $\frac{Hg}{l}$ ۲۲۷۲۰ است) از مزایای این روش رسم نمودار توسط خود سیستم می‌باشد همچنین مقدار دقیق آندوتوکسین را مشخص می‌کند در حالی که در دو روش قبلی تنها وجود و عدم وجود آندوتوکسین مورد بررسی 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، پیروزن، 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

از تخریب دیواره سلولی باکتری آزاد شود. آندوتوکسین می‌تواند با گیرنده‌های خاص بر روی سلول‌های ایمنی ارتباط برقرار کند و بیان بیش‌ازحد طیف گسترده‌ای از واسطه‌های ایمنی، از جمله سیتوکین‌های التهابی، اکسید نیتریک و ایکوزانوئیدها را القا کند. در نتیجه، پاسخ‌های حاد ایمنی ممکن است توسط سطح آندوتوکسین در سطح مشخصی ایجاد شود (۱). تست‌های LAL، TOC و پیروزن خرگوش روش‌های سنتی برای مطالعه آلودگی به

امروزه با پیشرفت صنایع داروسازی و سرم‌سازی نقش فرآورده‌های تزریقی بر کسی پوشیده نیست. ماده اصلی سازنده سرم‌ها آب می‌باشد لذا کسب اطمینان از موردپسند بودن آب مصرفی در این صنایع از درجه اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. آندوتوکسین که با نام لیپوپلی ساکارید (LPS) نیز شناخته می‌شود، اصلی‌ترین ماده تشکیل‌دهنده دیواره سلولی بیرونی باکتری‌های گرم منفی است که می‌تواند پس

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی فیزیولوژی حیوانات، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)

پایروژن خرگوش و تست LAL تحت تأثیر هیدروکسید آلومینیوم قرار نگرفته است. باین حال تست LAL در تشخیص اندوتوکسین دارای عملکرد بسیار حساس و دقیق تری 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 به منظور 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 سویه DH5 α مطابق با دستورالعمل، در محیط کشت (Eosin EMB (methylene blue به صورت 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 به عنوان مرجع استفاده می‌شود (۹). اما در این مطالعه مقدار کدورت سوسپانسیون ایجاد شده کمتر از نیم مک فارلند در نظر گرفته شد تا مقدار باکتری کمتر باشد و روش‌های مورد بررسی با دقت بالاتری مقایسه شوند. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری به وسیله سوآپ استریل چند کلنی به لوله‌ی حاوی آب WFI و لوله‌ی حاوی سرم فیزیولوژیک استریل منتقل شد و پس از مخلوط شدن سوسپانسیون در دستگاه vortex mixer، کدورت حاصله در مقابل شعله چراغ گازی مقایسه شد به طوری که کدورت هر دو یکی شود و کمتر از کدورت نیم مک فارلند شود. پس از استریل کردن و نام گذاری 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 ۱^{-۱}، ۱ml از آن در شرایط استریل به لوله‌ی بعدی انتقال داده شد. مرحله‌ی قبل به ترتیب برای لوله‌های بعدی

اندوتوکسین است. هر سه آزمایش دارای سابقه طولانی در استفاده از داروهای سنتی و وسایل پزشکی بوده و به طور معمول در تولید دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند از این رو 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 اندوتوکسین باکتریایی در نمونه‌های تزریقی پرداخت. او نشان داد که روش LAL (Gel-clot) به علت ارزانی، سادگی و حساسیت بالا در داروهای که فاقد اثرات مهاری و تشدید می‌باشند یا این اثرات در آن‌ها قابل حذف می‌باشد مناسب بوده ولی در مورد داروهایی که به دلیل عدم امکان کنترل اثر مهاری و تشدید می‌باشند (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 باکتریی ناشی از باکتری - های 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 قابل دسترس می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد در شناسایی بیماران مبتلا به باکتریی 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 از نظر ضوابط میزان کل مواد آلی پرداخت. وی گزارش نمود که به منظور سنجش سطح کل مواد آلی در غلظت‌های اندک پیشنهادی برای آب مورد استفاده در صنایع دارویی، آزمون کل کربن آلی (TOC) به دلیل دقت بالا و سرعت و هزینه مناسب یکی از پرکاربردترین گزینه‌ها به شمار می‌رود باین حال 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 هیپاتیت B دارای هیدروکسید آلومینیوم به دو روش تست پایروژن خرگوش و تست LAL پرداختند. آنان در مطالعه خود از هیدروکسید آلومینیوم به عنوان ادجوانت^۱ در واکسن هیپاتیت B استفاده کردند. نتایج نشان داد که سنجش LPS توسط هر دو تست

^۱ ادجوانت‌ها، 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.

بودند ۱ ml از نمونه موجود در لوله ۱۰^{-۱} به بالن ژوژه اضافه شد. سپس ۱ ml 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 خشک کردن 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 ۵۰۰ μg per liter 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 آمیبوسه‌های 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 (۲). این کیت‌ها علاوه بر آمپول‌های معرف LAL شامل کیت‌هایی حاوی آندوتوکسین بودند که به‌عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود. اگر ۱ ml /۰ 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 ۱ ml /۰ آب بدون پیروژن تکرار شود به خاطر عدم وجود آندوتوکسین هیچ ژلی تشکیل نمی‌شود. از آنجایی که مقدار pH نمونه‌ها در نتیجه آزمایش تأثیرگذار است، قبل از آزمایش pH نمونه‌های مورد آزمایش با کاغذ pH سنج اندازه‌گیری شد که در دامنه مجاز (۸-۵) تنظیم شد (۱۱، ۱۴). سپس این آزمایش با ml /۰ 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. پس‌از آن به مدت ۴ روز دمای آن‌ها اندازه‌گیری شد به این صورت که دماسنج را در رکتوم آن‌ها قرار داده شد

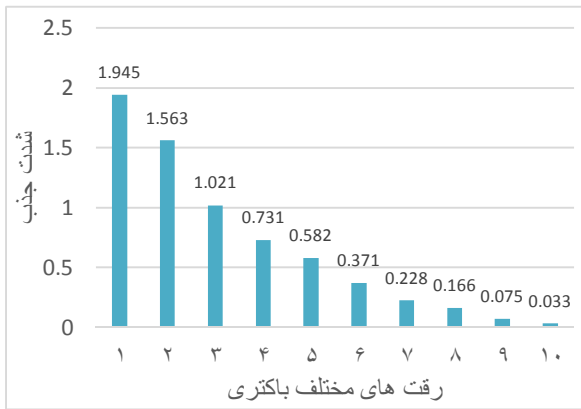
نیز تکرار شد تا رقت ۱۰^{-۱} به دست آید. رنگ کمرنگ‌تر نشان‌دهنده‌ی رقیق‌تر شدن سوسپانسیون اولیه بود. همین مراحل با سرم فیزیولوژیک نیز تکرار شد تا با روش سریالی ۱۰ رقت متفاوت از باکتری E.Coli به دست آید. سپس برای اطمینان از درستی رقت سازی سریالی، نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شدند و میزان جذب نور در چهار طول موج 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 ۱ ml را معادل ۲۰ قطره از باکتری بدانیم و هر لوپ برابر $\frac{1}{3}$ قطره از باکتری باشد پس تعداد باکتری‌های موجود در ۱ ml از سوسپانسیون باکتری استفاده شده قابل محاسبه می‌شود.

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

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 در نهایت 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 نکه 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 ۱۰۰ ml از نمونه را با 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 ۹۹ ml آب WFI را با استوانه مدرج اندازه‌گیری کرده و داخل بالن ریخته سپس با استفاده از سمپلر ۱ ml و سرسمپلر که قبلاً استریل شده



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

تعداد کلنی‌های رشد کرده در رقت‌های مختلف باکتری و تعداد باکتری‌ها در ۱ ml از رقت‌های مختلف به ترتیب در جداول (۲) و (۳) نشان داده شده است. همچنین تعداد باکتری‌ها در ۱ ml 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	۱-۱۰	۴۰۰۰
۲	۲-۱۰	۳۲۰۰
۳	۳-۱۰	۲۴۰۰
۴	۴-۱۰	۱۶۰۰
۵	۵-۱۰	۷۲۰
۶	۶-۱۰	۲۸۰
۷	۷-۱۰	۱۳۰
۸	۸-۱۰	۵۰
۹	۹-۱۰	۱۳
۱۰	۱۰-۱۰	۸

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 بدین صورت که به ازای هر کیلوگرم از وزن خرگوش ۱ ml 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

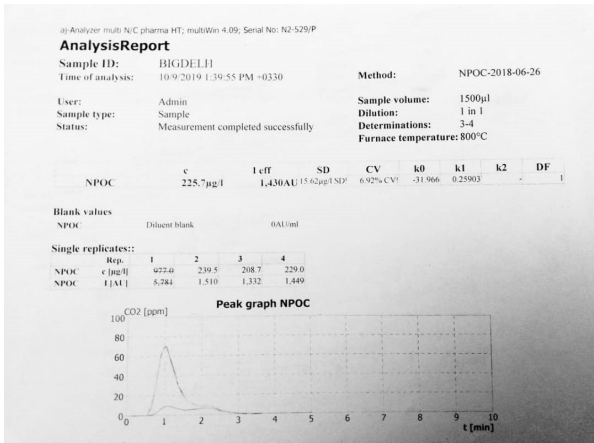
به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر از غلظت‌های هر یک از سوسپانسیون‌های مورد آزمایش در چهار طول‌موج متفاوت ۴۲۰، ۴۸۰، ۵۲۰ و ۵۴۰ نانومتر سنجیده شد. مشاهده شد که ماکزیمم طول‌موج ۴۸۰ nm می‌باشد که نتایج آزمایش در جدول (۱) ارائه شده است. همچنین پاسخ دستگاه اسپکتروفوتومتر در برابر غلظت‌های مختلف باکتری در شکل (۱) 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 10^{-1} بیشتر از همه و در رقت 10^{-10} کمتر از همه می‌باشد. از این رو می‌توان دریافت که روش رقت‌سازی مورد استفاده 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 ۴۸۰ nm

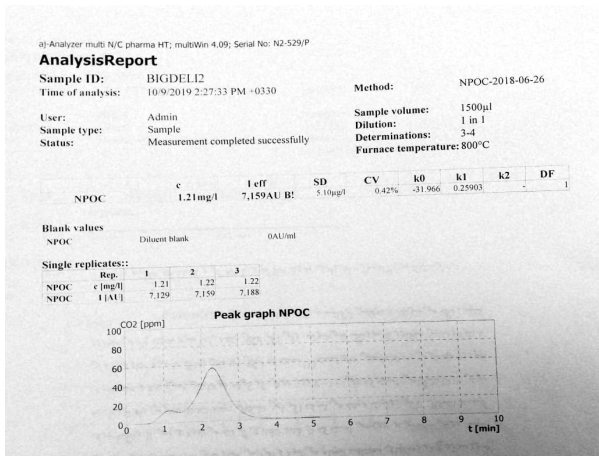
شماره	رقت مورد آزمایش	مقدار جذب
۱	۱-۱۰	۱/۹۴۵
۲	۲-۱۰	۱/۵۶۳
۳	۳-۱۰	۱/۰۲۱
۴	۴-۱۰	۰/۷۳۱
۵	۵-۱۰	۰/۵۸۲
۶	۶-۱۰	۰/۳۷۱
۷	۷-۱۰	۰/۲۲۸
۸	۸-۱۰	۰/۱۶۶
۹	۹-۱۰	۰/۰۷۵
۱۰	۱۰-۱۰	۰/۰۳۳

جدول (۳): تعداد باکتری ها در ۱ ml از رقت های مختلف

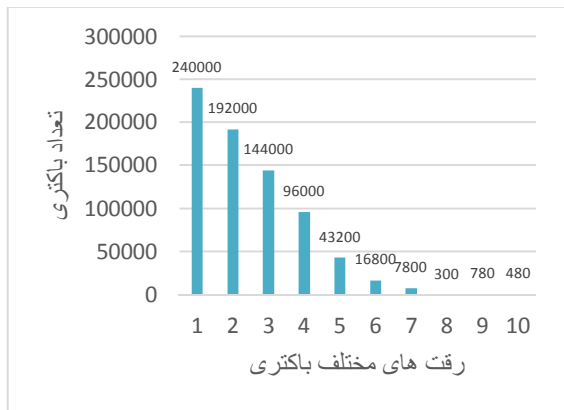
شماره	رقت های مختلف باکتری	تعداد باکتری
۱	۱-۱۰	۲۴۰۰۰۰
۲	۲-۱۰	۱۹۲۰۰۰
۳	۳-۱۰	۱۴۴۰۰۰
۴	۴-۱۰	۹۶۰۰۰
۵	۵-۱۰	۴۳۲۰۰
۶	۶-۱۰	۱۶۸۰۰
۷	۷-۱۰	۷۸۰۰
۸	۸-۱۰	۳۰۰
۹	۹-۱۰	۷۸۰
۱۰	۱۰-۱۰	۴۸۰



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



شکل (۴): منحنی مقدار کربن آلی در نمونه رقت ۱-۱۰



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

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

شکل (۲): تعداد باکتری ها در ۱ ml از سوسپانسیون

منحنی مقدار کربن آلی در نمونه شاهد و نمونه های با رقت ۱-۱۰ به ترتیب در اشکال (۶ و ۷) نشان داده شده اند. 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 به دست آمده نیز ۰/۰۱ مقدار واقعی است که مقدار واقعی در جدول ۴ ارائه شده است. همچنین نمودار مقایسه مقدار کربن آلی موجود در رقت های 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 $500 \frac{\mu g}{l}$ باشد، اما نمودار نشان می دهد در کمترین رقت مورد استفاده شده تعداد کربن در هر لیتر $22720 \frac{\mu g}{l}$ است، پس قابل استفاده نیست و دستگاه توانایی اندازه گیری کمترین مقدار باکتری موجود در محلول مورد آزمایش را دارد.

می‌باشد که با آمپوسیت‌ها واکنش داده و تشکیل ژل صورت گرفته است (شکل ۶). اما در آمپول‌های حاوی ۰/۱ ml 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).



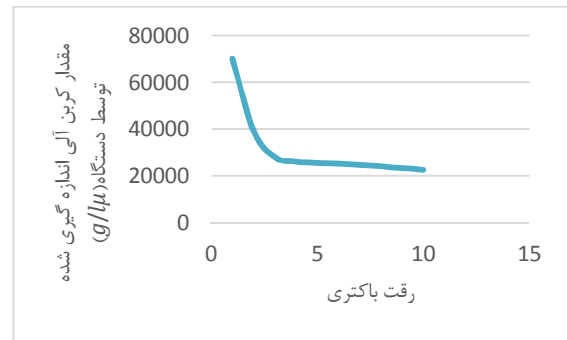
شکل (۶): تشکیل ژل در آمپول حاوی ۰/۱ ml از رقت 10^{-1} باکتری (+)



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



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



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 37°C و قرار دادن در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه هر یک از آمپول‌ها برای مشاهده نتیجه حاصله به زاویه 45° درجه منحرف گردید، در صورتی که ژل سخت تشکیل شده باشد به طوری که 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 مورد استفاده 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}	\pm
۱۰	10^{-10}	-

اگر هیچ تغییری در مایع در مقایسه با شکل اولیه آن حاصل نشده باشد یعنی آندوتوکسین وجود نداشته است و یا به قدری کم می‌باشد که آمپول LAL توانایی تشخیص آن را ندارد که در جدول با علامت (-) نشان داده شده است. اگر ژل ناهموار به صورت دانه‌دانه تشکیل شود ویسکوزیته آن به وضوح بالا رفته است و آندوتوکسین در محلول کم می‌باشد که با علامت (\pm) نشان داده شده است. در رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-8} واکنش تشکیل ژل انجام شده است که نشان‌دهنده وجود آندوتوکسین در این محلول‌ها

فقط در یک مورد را نشان داده و این تست برای سنجش مقدار آندوتوکسین در آب WFI مناسب نمی باشد.

علاوه بر این مشکلاتی اعم از تغییرات شرایط فیزیولوژی بدن خرگوش ها و تغییر شرایط آزمایشگاهی بر نتایج آزمایش تأثیر می گذارد، احتمال خطا را افزایش می دهد اما باین حال این روش نسبت به دو روش دیگر از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه تر می باشد.

نتایج به دست آمده از تست های LAL انجام شده بدین ترتیب بوده است که در آمپول های حاوی ۱ میلی لیتر رقت های از رقت های 10^{-1} تا 10^{-8} از آندوتوکسین پاسخ به صورت ژل سخت نمایان شده که وجود قطعی آندوتوکسین را نشان می دهند و در آمپول های حاوی $0/1$ میلی لیتر از رقت 10^{-9} تا 10^{-10} آندوتوکسین پاسخ به صورت ژل نرم و پیدایش ویسکوزیته بالا نمایان شده بود که احتمال وجود آندوتوکسین را نشان می دهد و در آمپول های حاوی $0/1$ میلی لیتر از رقت 10^{-10} آندوتوکسین محلول به صورت روان مشاهده شده که می توان 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 می باشد. 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 می توان بیان کرد که این تست نیز قادر به نمایان کردن مقدار کم آندوتوکسین نمی باشد اما احتمال خطای این روش نسبت به روش قبلی کمتر می باشد. 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 می رود 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 به خوبی عاری از پیروژن نگردیده باشد موجب آلودگی در مورد آزمایش به آندوتوکسین شود و نتایج آزمایش را به درستی منعکس نکند.

برتری تست LAL بر تست خرگوش امری واضح می باشد و پژوهش های گسترده ای در این باره انجام گرفته است در سال های گذشته FDA اعلام کرد که برای فرآورده های تزریقی و آنتی بیوتیکی و بیولوژیکی انسانی و دامی می توان به جای تست پیروژن و رسمی خرگوش از تست LAL به عنوان تست نهایی فرآورده ها استفاده کرد، در کل می توان بیان داشت تست LAL برای آزمودن پیروژن سسته فرآورده های دارویی و وسایل پزشکی در کشورهای خارجی با استقبال زیادی مواجه بوده است. اما از معایب این روش می توان به گران بودن این تست و همچنین در دسترس نبودن آن اشاره کرد، علاوه بر این شرایط نگهداری این تست خاص می باشد و باید آمپول ها در دمای خاصی نگهداری شوند.

با استناد به جدول ۴ دستگاه TOC توانایی اندازه گیری حتی کمترین مقدار آندوتوکسین در نمونه ها را نیز دارد و مشاهده شد که حتی در کمترین رقت مورد استفاده یعنی نمونه 10^{-10} نیز مقدار

پس از انجام تست خرگوش تمامی دماهای یادداشت شده و پس از میانگین ۴ دمای قبل از آزمایش و ۶ درجه حرارت ثبت شده پس از تزریق برای هر گوش محاسبه شد. سپس با درجه حرارت قبلی مربوط به همان خرگوش مقایسه شد که نتایج حاصله به طور جداگانه در جدول (۶) آورده شده است. طبق دستورالعمل مندرج در USP (United States Pharmacopeia) اگر اختلاف دمای قبل و بعد از تزریق از $0/6$ درجه سانتی گراد بیشتر باشد خرگوش به تست پیروژن پاسخ + داده است که در رقت های تهیه شده در آندوتوکسین فقط در یک مورد دیده شد. البته باید گفت که در اکثر موارد در مورد بالاترین غلظت آندوتوکسین میزان افزایش درجه حرارت خرگوش ها در مقایسه با غلظت های پایین تر آندوتوکسین بیشتر بوده، اما به هر حال فقط $0/6$ درجه سانتی گراد تغییر در غلظت مشاهده شد.

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

شماره خرگوش	وزن پیش از تزریق (g)	مقدار محلول تزریق شده (ml)	میانگین درجه حرارت قبل از تزریق (°C)	میانگین درجه حرارت بعد از تزریق (°C)	اختلاف درجه حرارت پیش 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 نتیجه گیری

نتایج حاصله از تست های خرگوش انجام شده نشان داد که واکنش افزایش دمای بدن خرگوش در مقابل تزریق محلول های حاوی رقت های مختلف آندوتوکسین یکسان نبوده ولی به جز یک مورد که در خرگوش اول که از آندوتوکسین محلول رقت 10^{-1} به آن تزریق شد این افزایش حرارت پایین تر از $0/6$ °C بوده و می توان بیان کرد که اختلاف معناداری بین دمای بدن خرگوش های ۲-۳-۴-۵-۶-۷-۸-۹-۱۰ نبوده و تنها خرگوش شماره ۱ دارای اختلاف معنادار با سایر خرگوش ها می باشد و با توجه به آزمایش های قبلی اعم از نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتر یا رشد باکتری ها در محیط کشت EMB از وجود باکتری در تمام رقت ها اطمینان حاصل شد بنابراین تست خرگوش توانایی نشان دادن آندوتوکسین

Ecoli کار شده است. قبل از انجام آزمایش LAL باید pH محلول‌ها را در محدوده قابل قبول 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 مورد استفاده 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 ۲۰ درصد، کلر و آلومنیوم ۱۵ درصد و بتامتازون) با استفاده از محلول‌های تازه تهیه شده 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 تنظیم شده است پس انتظار نمی‌رود نتیجه چندان درستی حاصل گردد. نتایج حاصل از این پژوهش با آنچه از پژوهش ما حاصل گردیده تقریباً مشابه می‌باشد بدین صورت که نتایج حاصل از آزمایش‌ها LAL انجام شده بر روی محدوده وسیعی از غلظت‌های آندوتوکسینی بین ۰/۰۵ 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 به عبارتی دیگر مرحله ایجاد ژل نرم (پاسخ +) در مورد آب مقطر استریل قابل تزریق به میزان واحد آندوتوکسین در هر میلی‌لیتر از محلول (۵۰ بیکو گرم در میلی‌لیتر) و در مورد جنتامایسین، دکستروز، کورتیکو تروئیدها و ویتامین‌ها به میزان ۰/۵ واحد آندوتوکسین در هر میلی‌لیتر از محلول (۱۰۰ بیکو در میلی‌لیتر) می‌باشد.

روش انجام تست خرگوش مشابه آنچه ما انجام دادیم می‌باشد، بدین صورت 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 قابل ملاحظه‌ای در درجه حرارت مشاهده نمی‌شد. به طوری که 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 ۰/۰۵، ۰/۰۵، ۰/۰۵، ۰/۰۵، ۰/۰۵ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن خرگوش منفی و در حضور غلظت آندوتوکسین ۵۰ واحد به ازای

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 در حالی که دو روش قبلی تنها وجود و عدم وجود آندوتوکسین را مورد بررسی قرار می‌دادند و همین‌طور احتمال خطا در این روش به حداقل می‌رسد، در این روش قابلیت تکرار آزمایش‌ها در سطح بالا وجود دارد. اما شایان ذکر 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 آلی می‌باشد که ممکن است در نتیجه آزمایش تأثیر بگذارد. علاوه بر این، این دستگاه هزینه بسیار زیادی دارد و به راحتی قابل دسترسی 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 مورد استفاده در پزشکی و داروسازی در تحقیقی مشابه که توسط آقای جمشیدی در سال ۱۳۶۲ در دانشگاه تهران به منظور 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 LAL مورد بررسی قرار گرفته است بدین صورت که از محلول‌های مورد استفاده در داروسازی و پزشکی مانند: آب مقطر استریل قابل تزریق، محلول تزریقی کلر و سدیم ۰/۹ درصد، محلول تزریقی گلوکونات کلسیم ۱۰ درصد، محلول تزریقی سولفات منیزیم ۱۰ درصد، محلول سولفات سدیم ۳/۸۹ درصد، محلول کلرور آلومینیوم ۱/۱۵ درصد، محلول تزریقی لاکتات سدیم ۲ درصد، محلول سیترات سدیم ۴ درصد، محلول فسفات سدیم، محلول تزریقی دکستران آهن، محلول تزریقی ویتامین ث، محلول تزریقی ویتامین B₁₂ محلول تزریقی ویتامین ب-کمپلکس، محلول تزریقی بتامتازون، محلول تزریقی دگزا متازون و محلول تزریقی جنتامایسین انتخاب شده و پس از آلوده شدن به آندوتوکسین با غلظت‌های معین مورد آزمایش قرار گرفته است. به منظور آلوده ساختن محلول‌های مورد آزمایش با غلظت‌های مختلف آندوتوکسین از آمپول‌های حاوی آندوتوکسین که جهت انجام آزمایش کنترل مثبت همراه کیت LAL عرضه می‌گردد استفاده شده است یعنی این پژوهش بر روی آندوتوکسین باکتری خاصی انجام نشده است در حالی که در پژوهش ما اختصاصاً بر روی آندوتوکسین باکتری

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 پاپروژن 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 پاپروژن خرگوش پرداخته-اند. (۱۷)

در مطالعه‌ای با عنوان "بررسی سلول‌های مونوسیتوئید انسان به‌عنوان شاخص‌های اندوتوکسین: مقایسه شده توسط تست LAL و تست پاپروژن 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 پاپروژن خرگوش اشاره شده است. در روش تست پاپروژن 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 این چنین مطالعات بی‌تأثیر نمی‌باشد. (۱۸)

پژوهشی بر مبنای بررسی سطح اندوتوکسین خون بیماران همودیالیزی و مقایسه آن با کشت خون توسط حاجی قاسمیان صفایی، انجام شد، هدف از این تحقیق ارزیابی آزمایش لیمولوس در تعیین اندوتوکسین خون مبتلایان به باکتری ناشی از باکتری‌های گرم منفی و نتیجتاً شناسایی سریع باکتری می‌بود 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 از نظر 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 از نقطه‌نظر غلظت کربن آلی مورد بررسی قرار داده است که تمامی نمونه‌ها از شرایط خوبی برخوردار بوده و استانداردهای مربوطه پیروی می‌کردند. با این وجود نسبت پیروی از روابط مذکور در هیچ‌کدام از نمونه‌ها یکسان نبوده و اختلاف معناداری بین آب‌های دارویی با برندهای مختلف مشاهده می‌گردد اختلاف موجود بین قرائت‌های مختلف دستگاه برای تکرارهای متناوب مربوط به هر کدام از نمونه‌ها اندک بوده و این تفاوت‌های کم به‌عبارت‌دیگر انحراف معیار کم‌مقدار قرائت‌ها برای تکرارهای مختلف صورت گرفته نشان‌دهنده دقت بالای آزمایش‌ها است (۶).

از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که شرایط آب دارویی مورد مطالعه از نقطه‌نظر محتوای سطح کربن در محدوده مورد قبول واقع گردیده است. یافته‌ها، تحلیل‌ها و مقایسه‌هایی که صورت

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 B₁₂ و ویتامین B₁₂ و 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 از جمله به‌عنوان روش کنترل در حین ساخت فرآورده‌های تزریقی و کنترل نهایی وسایل مورد استفاده قرار گرفته 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 میکروارگانیزم‌های 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 آزمایش LAL 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 میکروارگانیزم-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 پاپروژن خرگوش" از بین ۴۶ نمونه مورد آزمایش، دو نمونه در هر دو تست مثبت گزارش شده و پنج

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 با اینکه 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 پیروژن 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.

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 اندازه‌گیری، محدوده وسیع غلظت‌های مورد اندازه‌گیری، زمان کوتاه آنالیز و نیز هزینه مناسب آن می‌باشد (۱۹). با توجه به مقایسه پژوهش‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت که نتیجه حاصل شده از پژوهش ما با سایر پژوهش‌های دیگر هم‌خوانی دارد. در نتیجه دستگاه TOC نتایج دقیق‌تری نسبت به دو روش دیگر ارائه می‌دهد.

References:

- 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>
- Dobrovol'skaia 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.
- Gharacheh S, Evaluation of water quality in pharmaceutical industries in terms of total organic matter criteria. (Dissertation). Islamic Azad University; 2016.
- 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
- 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.
- Ghasemian- Safaai 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.
- 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.
- 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.
- Jamshidi MH. Campovision 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.
- Ghanbari M R. Changes in interleukin 6 in miss serum after experimental in flammation of chorio amnion

- 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. Comparision of lal and rFC Assaya-Participation in a proficiency test program between 2014 and 2019. *Microorganisms*2020; 8(3):418.
 12. Moser CP. Understanding the limulus ameobocyte lysate and rabbit pyrogen test for low endotoxin recovery studies. *Am Pharm Rev*2015; 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 Ameobocyte 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 monocytoïd 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](http://civilica.com/doc).

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 Bigdeli¹, 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)