

Колонка редактора

Тема этого номера была подсказана нашими коллегами, которые сегодня сталкиваются с необходимостью проведения депирогенизации посуды и оборудования, а также с необходимостью проведения валидации этой процедуры. И теория, и практика депирогенизации неразрывно связаны с ЛАЛ-тестом. Действительно, удаление или инактивацию именно эндотоксинов грамотрицательных бактерий, а не каких-то других пирогенов. Поэтому вполне закономерным представляется использование этого метода в качестве средства оценки степени разрушения эндотоксинов. Более того, именно благодаря ЛАЛ-тесту была сформулирована современная концепция оценки эффективности процедуры депирогенизации.

Первая статья представляет собой обзор различных способов депирогенизации и касается общих принципов оценки эффективности этой процедуры.

Вторая статья носит более выраженный практический характер, и в ней мы попытались обрисовать правила проведения валидации процедуры депирогенизации. В качестве примера был выбран наиболее распространенный способ депирогенизации – разрушение эндотоксинов сухим жаром. Этот метод с равным успехом применяется и для подготовки лабораторного оборудования, используемого для проведения ЛАЛ-теста, и для депирогенизации флаконов и ампул, используемых в производстве лекарственных препаратов.

Третья статья является непосредственным продолжением второй и посвящена тем средствам или инструментам, с помощью которых проводится оценка эффективности процесса термической депирогенизации – специальным стандартам эндотоксина.

Депирогенизация

Ситников А.Г.

Депирогенизацией называют процедуру устранения или разрушения пирогенов. Оценка эффективности этого процесса проводится с помощью ЛАЛ-теста, который позволяет количественно оценить содержание эндотоксинов до и после обработки. Сразу хочется отметить, что все существующие ныне способы депирогенизации являются, в сущности, способами устранения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Поэтому, несмотря на то, что сам термин «депирогенизация» предполагает достаточно широкую трактовку, в данном случае пирогенами все же считаются только эндотоксины грамотрицательных бактерий. Причиной тому несколько обстоятельств:

Первое – эндотоксины наиболее распространенные и наиболее сильные пирогены, к тому же очень устойчивые. Поэтому принято считать, что если процесс депирогенизации приводит к разрушению эндотоксинов, то он однозначно будет гарантировать и отсутствие других пирогенов (правда, это положение относится главным образом к процедуре термической депирогенизации).

Второе – модельные загрязнения, необходимые для оценки эффективности процесса, проще всего делать с помощью высокоочищенных препаратов ЛПС. Это контрольные стандарты эндотоксина, свойства которых, включая их стабильность, давно изучены.

И, наконец, третье – количественное выражение результата процесса возможно только с помощью ЛАЛ-теста.

ЛАЛ-тест благодаря очень высокой чувствительности и возможности проводить точную оценку содержания эндотоксинов оказался серьезным стимулятором исследований процессов депирогенизации. Он же оказался и основным инструментом стандартизации этих процедур.

Депириогенизации могут подвергаться самые разные объекты. Вопросы удаления эндотоксинов актуальны для растворов, например, для готовых лекарственных форм или концентратов, используемых для их приготовления. В определенных случаях может понадобиться депириогенизация субстанций или вспомогательных веществ. Не должны содержать эндотоксинов и контейнеры, используемые для первичной упаковки лекарственных средств (ампулы, флаконы). Многие изделия медицинского назначения также должны быть свободны от эндотоксинов. Проведение ЛАЛ-теста невозможно без депириогенизированных пробирок и пипеток. Наконец, вода для инъекций должна быть свободна от эндотоксинов, т.е. должна быть депириогенизирована. Очевидно, что при таком разнообразии объектов, подлежащих депириогенизации, должно существовать и большое количество разных вариантов проведения этой обработки. Обычно способы депириогенизации делят на две большие группы. К первой группе относятся методы обработки, приводящие к удалению эндотоксинов с поверхности изделий или из растворов. Вторая группа объединяет методы обработки, приводящие к разрушению или инактивации эндотоксинов. Представляется, что термин «инактивация» в большинстве случаев оказывается наиболее подходящим, поскольку он относится к биологическим свойствам молекулы, а не описывает ее структурную целостность.

Методы удаления эндотоксинов.

Методы удаления эндотоксинов очень разнообразны, многие из них просты и легко воспроизводимы. К сожалению, эффективность этих методов может оказываться невысокой, а способы оценки этой эффективности могут быть сложными и не очень надежными.

Самый простой способ удаления эндотоксинов с поверхности оборудования или медицинских изделий - это многократное ополаскивание чистой водой (водой для инъекций). Этот способ применим к материалам, не выдерживающим жесткой обработки, таким как резиновые пробки, пластмассовые изделия и пр. Эффективность метода зависит от чистоты воды, количества повторов циклов ополаскивания. Результат обработки в значительной степени зависит от адгезивных свойств материалов. Так, хорошо известно, что эндотоксины способны очень хорошо удерживаться на поверхности пластиковых изделий, особенно изготовленных из полиэтилена. В этом случае даже многократное ополаскивание может оказаться бесполезным.

Для удаления эндотоксинов из растворов довольно широко используется метод

ультрафильтрации. Добиться эффективного удаления эндотоксинов можно, используя фильтры с пределом разделения по молекулярному весу - 10 000 - 100 000 Дальтон. Столь широкий диапазон определяется специфическими свойствами молекулы эндотоксина. Обычно в растворах эндотоксины образуют мицеллы с молекулярным весом в 10 000 - 20 000. Если в растворах присутствуют положительно-заряженные ионы, то вокруг них образуются очень крупные агрегаты с молекулярной массой более 100 000 Дальтон. Следовательно, эффективность процедуры ультрафильтрации во многом зависит от свойств раствора. Поэтому и подбирать технологию отделения эндотоксинов с помощью ультрафильтрации необходимо индивидуально.

Удалять эндотоксины можно и с использованием активированного угля или с помощью фильтров на основе активированного угля. Причем последний способ представляется более приемлемым, поскольку он снимает проблему, связанную с удалением этого сорбента из обработанного раствора. В тоже время, высокая сорбционная способность активированного угля ограничивает возможности метода, поскольку велика вероятность снижения концентрации активного вещества, изменения состава раствора и его свойств.

Поскольку молекулы эндотоксина отрицательно заряжены, они могут быть удалены из раствора за счет адсорбции на положительно заряженных фильтрах, например на фильтрах из асбеста. Особенно эффективным может быть использование глубоких асбестовых фильтров. К недостаткам метода можно отнести возможность связывания молекул активной субстанции и ограничения по использованию асбеста в фармацевтическом производстве.

Очень хорошим способом удаления эндотоксинов является обратный осмос. Действительно, размеры пор обратноосмотической мембраны настолько малы, что способны пропускать только молекулы воды, задерживая «крупные» ионы и органику. Обратный осмос является очень популярным способом подготовки воды благодаря высокой производительности и экономичности. Вместе с тем метод этот не может считаться абсолютно гарантирующим отсутствие эндотоксинов. Качество воды на выходе из RO-мембраны в большой степени зависит от качества исходной воды, состояния мембраны и многих других показателей.

К способам удаления эндотоксинов может быть отнесена и дистилляция. Тем более что именно дистилляция считается одним из классических способов устранения пирогенов. Не случайно во всех фармакопеях именно

дистилляция упоминается как приемлемый способ получения воды для инъекций. В процессе дистилляции вода дважды проходит через стадии фазового перехода. Пары воды в принципе должны быть свободны от тяжелых молекул эндотоксина, а хороший дистиллятор должен обеспечивать отделение крупных капель воды от стерильного пара. После конденсации получается вода, свободная от эндотоксинов. Обычно проблемы возникают позже, и связаны они со способами хранения и распределения дистиллированной воды. Вообще, дистилляция является лучшим способом получения воды для инъекций, иными словами, лучшим способом депириогенизации воды, к сожалению, этот метод требует высоких затрат энергии.

К методам удаления эндотоксинов можно отнести и появившийся сравнительно недавно способ, в котором используется эндотоксин-связывающий белок (*endotoxin-binding protein*), выделенный из лизата амебоцитов *Limulus*. Этот белок считается естественным противовесом коагуляционной системы мечехвостов. Возможно, физиологическое предназначение этого белка – связывание небольших количеств эндотоксинов, попадающих в кровь мечехвостов. Его присутствие доставляет дополнительные проблемы производителям ЛАЛ-реактива, поскольку он снижает чувствительность системы коагуляции. Выделенный же в чистом виде он представляет собой прекрасный сорбент, специфически связывающийся с эндотоксином. На основе препаратов этого белка созданы фильтры и смолы, которые можно использовать для удаления эндотоксинов из растворов. Однако, надо сразу отметить, что производители (Associates of Cape Cod, США) сразу оговаривают область применения этих продуктов – только для исследовательских работ.

Подводя итог обзору способов удаления эндотоксинов, необходимо обратить внимание на то, что большая их часть может быть отнесена к способам фильтрации, но фильтрации через специальные фильтры. Обычная стерилизующая фильтрация через фильтры с размером пор 0,22 мкм (0,44 мкм) абсолютно неэффективна как средство депириогенизации. Эти фильтры задерживают микроорганизмы, эндотоксины же представляют собой лишь небольшой фрагмент внешней стенки бактерий. Чтобы представить себе отношение масштабов можно привести следующий пример – на поверхности только одной грамтрицательной бактерии может находиться до 3,5 миллионов молекул эндотоксинов.

Методы инактивации или разрушения эндотоксинов.

Вторая группа способов депириогенизации не менее разнообразна. Начать стоит с самого известного и надежного способа депириогенизации – термического.

Сухожаровая обработка при температуре 250°C в течение 30 минут приводит к практически полной инактивации эндотоксинов. Этот режим упомянут во всех фармакопеях. Ранее приемлемым режимом депириогенизации считался нагрев при температуре 180°C в течение трех часов. В частности, этот режим предлагался как средство подготовки посуды, используемой при проведении ЛАЛ-теста. Возможность количественного определения исходного и остаточного содержания эндотоксинов, проводимого с помощью ЛАЛ-теста, позволила значительно расширить представления о кинетике процесса депириогенизации и сформулировать представление об «идеальном» режиме депириогенизации. До появления ЛАЛ-теста адекватная количественная оценка режима была просто невозможна. В процессе изучения динамики термической депириогенизации было показано, что добиться разрушения молекул эндотоксина можно при температурах выше 180°C. При температуре 190°C разрушение эндотоксинов происходит за 65,4 минут, и достаточно всего 1,5 минуты для разрушения эндотоксинов при температуре 250°C. В тоже время при температурах ниже 180°C добиться значительного снижения концентрации эндотоксинов даже за счет увеличения времени экспозиции невозможно.

Процесс термической депириогенизации применим только к объектам, выдерживающим такую жесткую обработку. Актуальным этот процесс является для обработки стеклянной посуды, используемой для упаковки лекарственных средств или для проведения ЛАЛ-теста. Наконец, надо отметить, что процедура термической депириогенизации фактически означает и стерилизацию образцов, причем обратное утверждение неверно. Термическая (сухожаровая или паровая) стерилизация не всегда обеспечивает депириогенизацию обрабатываемых образцов.

Для инактивации эндотоксинов может быть использована ионизирующая радиация. Действительно, под действием гамма-излучения происходит снижение активности эндотоксинов и, возможно, частичное или полное разрушение молекулы ЛПС. Тем не менее, возможности применения очень ограничены, поскольку воздействие излучения приводит к значительным физическим и химическим изменениям обрабатываемых объектов.

Инактивации эндотоксинов можно добиться обработкой кислотой или щелочью. Гидролиз в кислой или щелочной среде приводит к частичному разрушению молекулы ЛПС и снижению ее биологической активности. Так под действием кислоты происходит гидролиз связи Липида А с центральной частью молекулы ЛПС, что приводит к высвобождению Липида А. Потеря гидрофильного полисахаридного хвоста изменяет способность к растворению этой наиболее активной в биологическом отношении части молекулы. Нагревание или кипячение ускоряют гидролиз и, возможно, разрушение молекулы эндотоксина оказывается более глубоким. В тоже время сохранение в нетронutom виде Липида А не должно внушать особого оптимизма, так как это самая активная и опасная часть молекулы. Если произойдет какое-либо изменение состава раствора, и растворимость Липида А улучшится, последствия могут быть очень неприятными. К тому же известно достаточно много работ, в которых убедительно продемонстрировано, что биологические свойства Липида А эквивалентны свойствам целой молекулы ЛПС.

Заключение

Представленный обзор методов депирогенизации получился далеко не полным, вместе с тем можно сделать несколько выводов. Во-первых, нет единого и абсолютного способа депирогенизации, все они «ограниченно годные», некоторые могут быть весьма эффективными, но не могут быть применены к растворам или к некоторым материалам. Во-вторых, эффективность одного и того же метода может быть разной в зависимости от свойств депирогенизуемого изделия (раствора). В-третьих, добиться значительного снижения исходной концентрации эндотоксинов позволяют лишь несколько из перечисленных методов, остальные позволяют снизить концентрацию эндотоксинов на некоторую величину, причем значение это может быть переменным и зависящим от множества факторов, трудно поддающихся стандартизации.

Поэтому, вне зависимости от того, какой способ депирогенизации используется, необходимо стремиться к тому, чтобы концентрация эндотоксинов еще до обработки была минимальной. Так, несмотря на то, что термическая депирогенизация является классическим и почти абсолютным оружием против эндотоксинов, необходимо проводить тщательную предварительную подготовку

депирогенизуемых объектов, направленную на максимально возможное снижение концентрации эндотоксинов на поверхности до начала обработки. Если речь идет о флаконах или ампулах, это означает проведение многократных циклов ополаскивания дистиллированной водой. Уже отмечалось, что такое ополаскивание может само по себе рассматриваться как способ депирогенизации. Поэтому в определенных случаях процедура депирогенизации может представлять собой комбинацию двух или более методов обработки.

При выборе процедуры депирогенизации, которая будет в дальнейшем валидироваться, необходимо помнить, что эффективность этого процесса должна быть выражена в количественных показателях. Процесс депирогенизации должен приводить к минимуму к снижению концентрации эндотоксина на три порядка, т.е. в 1000 раз, по сравнению с исходной концентрацией. Измеряется эффективность депирогенизации с помощью ЛАЛ-теста. Процедура оценки исходной и конечной концентраций эндотоксина должна быть логичной и воспроизводимой. Если при валидации используются методы внесения модельных загрязнений и/или если в процессе валидации необходима подготовка смывов или иных растворов эндотоксина, то все подготовительные операции должны быть тщательно отработаны и документированы.

Литература.

Tsuji K., Lewis A.R. // Dry-heat destructijn of lipopolysaccharide: Mathematical approach to process evaluation. Appl. Environ. Microbiol. 1978., Vol. 36., No. 5., P. 715-719.

Dawson M.E. Depyrogenation. // LAL Update. 1995, Vol. 11, No. 5.

Pearson F.C. // Pyrogens: Endotoxins, LAL testing and depyrogenation. Advances in parenteral sciences, Vol. 2. Marcel Dekker Inc. 1985. N.Y.

Williams K.L. // Endotoxins. Pyrogens, LAL testing and Depyrogenation.

END-X endotoxin removal filter. LAL Update 1990., Vol.8., No. 3.

Finkelman M.A. // END-X B15: new endotoxin removal device added to product line. LAL Update 1992. Vol.10., No.2.

Общие рекомендации по проведению валидации термической депирогенизации

Чиркова М.Н., Ситников А.Г.

Из всех известных способов депирогенизации наиболее распространенным и доступным является термическая депирогенизация, этот способ устранения эндотоксинов считается и наиболее надежным. Метод широко применяется для финишной депирогенизации лабораторной посуды, которую используют при проведении ЛАЛ-теста (флаконы, пробирки, стеклянные пипетки). Этот же способ является частью подготовки ампул или флаконов, используемых в производстве лекарственных препаратов. Конечно, сухожаровой шкаф и стерилизационный туннель - это совершенно разное оборудование, но принципиальной разницы в процедуре оценки эффективности их работы нет. И в том, и в другом случае процедура депирогенизации материалов, используемых в производственном процессе, должна быть валидирована. Сразу же возникает вопрос - на основании каких документов эта валидация должна быть проведена и по каким параметрам проверена?

Депирогенизация как средство подготовки посуды, используемой для проведения ЛАЛ-теста, упоминается в статье «Бактериальные эндотоксины» (ОФС 42-0002-00). В части работ, связанных с проведением валидации ЛАЛ-теста, ссылка на ОФС может оказаться достаточной для обоснования правильности принятых процедур подготовки материалов для анализа. Для проведения валидации промышленного оборудования требуется более детальная информация. К сожалению, в отечественной нормативной документации отсутствует даже само понятие «депирогенизация», нет и ясно сформулированного представления о том, к какому результату надо стремиться при проведении этой процедуры. Отсутствует и описание способов оценки эффективности депирогенизации. Приходится констатировать, что существующая на сегодняшний день отечественная нормативная база по процедуре депирогенизации явно недостаточна. Вместе с тем методы ее проведения и контроля известны и широко применяются за рубежом. В настоящей статье мы попытаемся обобщить известные сведения, касающиеся правил проведения термической депирогенизации, принципов организации валидации этого процесса и концепции оценки результатов такой обработки. В качестве примера можно остановиться на правилах депирогенизации посуды, используемой при проведении ЛАЛ-теста.

Для проведения депирогенизации посуды необходим сухожаровой шкаф, способный обеспечивать нагрев до 250°C, а желательно и больший. Если шкаф будет использоваться для одной этой цели, то объем камеры может быть небольшим - до 50-70 м³. Классическим режимом термической депирогенизации считается нагревание при температуре 250°C и выше в течение 30 минут и более. В принципе возможны изменения обоих показателей, правда, как правило, изменения эти делают в большую сторону. Можно и уменьшать значение одного параметра за счет увеличения другого. Например, для промышленного оборудования допустима обработка, при которой уменьшение времени компенсируется увеличением температуры. Некоторое снижение температуры за счет увеличения времени может быть необходимо при обработке объектов, для которых высокая температура может оказаться критической для их целостности (шланги, пробки). Не последнюю роль в выборе режима играют и затраты энергии на цикл обработки. В общем, изменять режим можно, но проще без серьезных на то оснований не экспериментировать и валидировать режим, считающийся общепринятым.

Сухожаровой шкаф нельзя назвать сложным лабораторным оборудованием, поэтому валидация (квалификация) его вполне может быть проведена самостоятельно, без привлечения специалистов. Тем не менее, процедура валидации процесса депирогенизации должна быть проведена в полном объеме.

На первом этапе проводится проверка комплектности поставки, установка и подключение оборудования. В ходе проверки необходимо убедиться в том, что реальные характеристики прибора соответствуют паспортным характеристикам: термометры показывают реальную температуру и т.д.

Далее проводится оценка процедуры нагрева уже с депирогенизируемыми изделиями. Это необходимо потому, что распределение температуры в камере может быть неравномерным, оно зависит от количества и размера обрабатываемых изделий, количества полок и т.д. Внутри камеры всегда есть «холодные зоны», в которых температура ниже, чем средняя температура, поддерживаемая во время процесса обработки. Встроенный же термометр или дисплей отражают всего лишь усредненную температуру, пусть даже по нескольким точкам. Именно поэтому замеры распределения температуры внутри камеры должны делаться при ее максимальной загрузке с целью определения холодных зон и времени, необходимого для их полного разогрева. Возможно, по результатам этих

измерений необходимо будет изменить параметры режима – увеличить температуру или время обработки.

После сбора всей необходимой информации можно переходить к последней стадии валидации, на которой подтверждается, что выбранный режим действительно обеспечивает депирогенизацию посуды. На этом этапе используются индикаторы эндотоксинов, позволяющие рассчитать уровень снижения концентрации эндотоксинов после проведения депирогенизации. Очевидно, что результат обработки должен иметь количественное выражение. По современным представлениям процесс депирогенизации считается эффективным в случае, если он приводит к снижению концентрации эндотоксинов не менее чем в 1000 раз (лучше в 10 000 раз). Т.е. если мы поставили в сухожаровой шкаф флакон с КСЭ, содержащим 1000 единиц эндотоксина, то после обработки содержание эндотоксина в таком флаконе должно быть менее 1 ЕЭ. Конечно, при проведении валидации одним флаконом КСЭ дело не ограничивается. Флаконы расставляются на нескольких полках: сверху, в середине и внизу шкафа. Обычно по 5 флаконов на полке – четыре по углам и один в середине. Если обнаружены холодные зоны, то и в эти зоны необходимо поставить флаконы с КСЭ. Несколько флаконов оставляют необработанными и используют в качестве контроля. После проведения обработки определяется содержание эндотоксина в обработанных и необработанных флаконах. Результаты анализа должны подтвердить, что концентрация эндотоксина после обработки снизилась не менее чем в 1000 раз.

Таким образом, валидация процесса депирогенизации складывается из нескольких следующих друг за другом этапов. Последовательность этих этапов совершенно стандартная (IQ, OQ, PQ). Реальная эффективность процесса проверяется на последнем этапе и в «худшем» варианте работы шкафа, т.е. при полной его загрузке.

Те, кто сегодня сталкивается с проблемой валидации процедуры депирогенизации, вынуждены решать эту задачу самостоятельно, опираясь на собственные знания и здравый смысл. Безусловно, огромным недостатком является отсутствие нормативной базы. Этот пробел должен быть восполнен, тем более, что сделать это не так уж и сложно. В отечественной Фармакопее есть статья «Стерилизация», в которой в подраздел выделена процедура «Воздушный метод стерилизации», предполагающая

проведение стерилизации в сухо-воздушных стерилизаторах при температурах 160, 180 или 200°C. В статье определены режимы стерилизации, способы контроля параметров этих режимов и способы оценки эффективности применяемых методов термической стерилизации. К сожалению, процедура депирогенизации в данной статье не рассматривается, хотя представляется, что раздел «Депирогенизация» вполне может стать составной частью этой статьи в будущем. Такое развитие возможно, тем более, что и в Фармакопее США, и в Европейской Фармакопее раздел «Депирогенизация» вырос из статьи «Стерилизация». Так, в Европейской Фармакопее в статье «Методы стерилизации» есть очень краткое описание процедуры депирогенизации, тем не менее почти исчерпывающее: «... обработка сухим жаром при температурах выше 200°C может использоваться для стерилизации и депирогенизации стеклянной посуды. Необходимо продемонстрировать, что процедура обеспечивает 1000-кратное снижение концентрации эндотоксина, который в этом случае используется вместо биотестов». В нынешней редакции статьи «Стерилизация» (ГФ XI) есть небольшой абзац: «... Допускается использование более высоких температур нагрева при соответствующем уменьшении времени стерилизационной выдержки, обеспечивающих стерильность и сохранность объекта. Режим должен быть обоснован и указан в нормативно-технической документации». Если заменить или дополнить слова «стерилизация» и «стерильность» на «депирогенизация» и «апиrogenность», этот небольшой абзац вполне может оказаться основой для будущего раздела «Депирогенизация».

Литература.

1. ГФ XI. Выпуск 2 «Общие методы анализа. Лекарственное и растительное сырье». // «Стерилизация». С. 19., М. 1998.
2. ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины».
3. European Pharmacopoeia. 2004. Appendix XVIII Methods of sterilisation (methods of preparation of sterile products).
4. United States Pharmacopoeia XXVII, 2004 <1211> Sterilization and sterility assurance of compendial articles
5. Dawson M.E. // Depyrogenation. LAL Update. 1995, Vol. 11, No. 5.

Контрольные стандарты эндотоксина, используемые для валидации процедуры депирогенизации

Демидова В.В., Ситников А. Г.

Для оценки эффективности процедуры депирогенизации могут быть использованы обычные контрольные стандарты эндотоксина, применяемые при постановке ЛАЛ-теста, а также специально предназначенные для этой цели препараты эндотоксина. В любом случае, препараты КСЭ, используемые для валидации депирогенизации, должны отвечать определенным требованиям, наиболее значимые из которых:

1. Содержание эндотоксина во флаконах должно быть достаточно высоким – более 1000 ЕЭ/флакон. Иначе невозможно будет продемонстрировать желаемую степень снижения концентрации эндотоксинов после депирогенизации.

2. Контрольный стандарт эндотоксина должен быть лиофильно высушен и не должен содержать наполнителей, так как препараты КСЭ с наполнителями менее устойчивы при нагревании, следовательно, полученные результаты могут оказаться слишком «оптимистическими».

Перечисленным требованиям отвечают не все препараты КСЭ, используемые при проведении ЛАЛ-теста, поэтому гораздо удобнее использовать препараты эндотоксина, созданные специально для проверки депирогенизации. Такие препараты (эндотоксины-индикаторы) содержат от нескольких тысяч до сотен тысяч единиц эндотоксина во флаконе.

Существует два метода оценки эффективности процедуры депирогенизации, соответственно, выпускается и два типа препаратов эндотоксинов-индикаторов.

Прямой метод оценки процесса депирогенизации является наиболее простым. Флаконы с КСЭ помещаются в валидируемый сухожаровой шкаф, несколько флаконов оставляют в качестве контроля. По окончании цикла депирогенизации проверяется остаточное содержание эндотоксина во флаконах, подвергнутых обработке, и в контрольных флаконах. Препараты КСЭ, предназначенные для проверки депирогенизации прямым методом, поставляются обычно в наборах, по 10-20 флаконов в наборе, содержание эндотоксинов в каждом флаконе обычно 1000 ЕЭ или более.

Непрямой метод предполагает создание модельного загрязнения флаконов, ампул и т.д. с помощью раствора КСЭ. Затем эти

изделия проходят цикл депирогенизации, по окончании которого проверяется остаточное содержание эндотоксинов, это значение сравнивается с содержанием эндотоксинов в контрольных изделиях. В данном случае необходимо отработать методику подготовки повторного разведения КСЭ (объемы воды, время растворения и т.д.), выяснив при этом, возможны ли потери, связанные с необратимой адсорбцией эндотоксина на поверхности изделия. Несмотря на то, что этот способ оценки сложнее, он позволяет проверить эффективность обработки разных изделий, причем сама депирогенизация не обязательно должна быть термической. Для проведения валидации непрямой методом предназначены флаконы КСЭ с очень высоким содержанием эндотоксина - от 10 000 до 1 000 000 ЕЭ/флакон, и для проведения валидации может оказаться достаточно одного - двух флаконов.

При проведении валидации сухожаровых шкафов проще всего использовать наборы флаконов КСЭ, предназначенные для проведения валидации прямым методом. Эти наборы сопровождаются инструкциями по применению, в которых очень подробно описаны правила проведения этой проверки. В качестве примера можно рассмотреть правила использования набора стандартов эндотоксина под названием **Endotoxin Challenge Vials™** известного производителя ЛАЛ-реактива – компании **CAMBREX**, США.

Набор состоит из 25 флаконов эндотоксина *E.coli* 055:B5, содержание эндотоксина в каждом флаконе более 1000 ЕЭ. Для проведения оценки содержания эндотоксина рекомендуется использовать ЛАЛ-реактив с определенной чувствительностью - 0,125 ЕЭ/мл. Понять, зачем это нужно, позволяет предложенная компанией очень простая и рациональная схема оценки процедуры депирогенизации.

Итак – часть флаконов из набора оставляется в качестве контроля, часть расставляется на полках сухожарового шкафа в заранее определенных точках, в том числе и в холодных зонах, где температура во время процесса депирогенизации минимальна. Флаконы не вскрывают, этикетки не снимают, все материалы выдерживают нагрев при 225°C в течение 8 часов. В инструкции есть интересная ремарка: «... при температурах выше 225°C текст этикетки может стать нечитаемым». Надо полагать, что при стандартных 250°C текст этикетки выгорит, но сама этикетка и пробка останутся целыми. После проведения цикла депирогенизации флаконы вынимают из шкафа и в обработанные и необработанные флаконы добавляют по 1,0 мл воды для ЛАЛ-теста, получившиеся растворы перемешивают и

анализируют с помощью ЛАЛ-реактива. Раствор КСЭ, полученный в необработанных флаконах, разводится водой для ЛАЛ-теста в 10 000 раз, результаты анализа должны быть положительными. Раствор КСЭ в обработанных флаконах проверяется без разведения, результаты должны быть отрицательными. Расчет концентрации эндотоксина делается обычным образом – фактор разведения умножается на чувствительность ЛАЛ-реактива (λ):

Образец	Фактор разведения	λ	Результат	Фактор разведения $\times \lambda$
Необработанные флаконы	10 000	0,125 ЕЭ/мл	+	Более 1250 ЕЭ/мл
Обработанные флаконы	1	0,125 ЕЭ/мл	-	Менее 0,125 ЕЭ/мл

До обработки во флаконах содержание эндотоксина было больше 1250 ЕЭ, а после обработки стало меньше 0,125 ЕЭ. Это означает, что в результате термической депирогенизации произошло снижение концентрации эндотоксинов более чем в 10 000 раз. Стоит обратить внимание на то, что схема проверки построена на уверенности в том, что обработка даст даже не 1000-кратное, а 10 000-кратное снижение концентрации эндотоксина. Собственно другого результата после прожаривания при 250°C ждать и не приходится. Впрочем, в инструкции оговорена и возможность демонстрации 1000-кратного снижения концентрации. Для этого предлагается испытывать раствор КСЭ, полученный для

обработанных флаконов в разведении 1/10 (фактор разведения 10, вместо 1). Такая процедура проверки не только очень проста, но, что представляется особенно ценным, она позволяет провести количественную оценку процедуры депирогенизации средствами качественного анализа.

Наборы для проведения валидации процедуры сухожаровой депирогенизации выпускают все компании-производители ЛАЛ-реактива. Торговые названия этих наборов разные, но назначение и способ использования одинаковы. В качестве иллюстрации можно привести названия и характеристики нескольких аналогичных наборов разных производителей.

Endotoxin challenge vials - 25 флаконов, более 1000 ЕЭ/фл. Компания Cambrex Bio Science.

Depyrogenation control vials - 10 или 50 флаконов, более 1000 ЕЭ/фл. Компания Associates of Cape Cod.

Endotoxin indicators - 12 флаконов, 2000 ЕЭ/флакон. Компания Chares River Endosafe.

Литература.

1. *Endotoxin Challenge Vials™, Cat No N187, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.*

2. *Endotoxin (E.Coli 0113:H10), Control Standard Endotoxin (CSE), Associates of Cape Code, Inc.*

3. *Endotoxin challenges in depyrogenation. LAL Update 1990, Vol. 8, No.1.*

«ЛАЛ-тест» - периодический бюллетень для специалистов, работающих в области фармации, медицины и биологии.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» выходит с периодичностью 4 раза в год.

Для оформления подписки просим отправлять заявки по почте:

ООО «ЛАЛ-Центр»

117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3а, комн. Б-421.

Тел.: (095) 517-40-37, т./факс: (095) 742-83-49,

E-mail: LALNews@Limulustest.ru

Бюллетень зарегистрирован в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации № 77-16115 от 11.08.03 г.

Главный редактор: Ситников А.Г.

Редакционная коллегия: Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Чиркова М.Н., Демидова В.В.

Подписано к печати: 15.08.2005 г.

Формат: А4; Бумага: супербелый лен 90 г/м²; Печать: Офсет; Объем: 8 стр.;

Тираж: 300 экземпляров.

Отпечатано в типографии ООО «Формула Цвета», Москва.



ЛАЛ-ЦЕНТР

О П Р Е Д Е Л Е Н И Е
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ