

## Наиболее распространенные ошибки опыта и их причины

Ситников А.Г.

### Колонка редактора

*Этот номер практически целиком посвящен проблемам, возникающим при проведении анализа. Первая статья задумывалась как общий обзор и классификация ошибок, наиболее вероятных при проведении опыта, главным образом тех ошибок, которые могут быть сделаны случайно. По мере подготовки статьи исходная идея несколько трансформировалась. Сейчас значительное место в ней занимает часть, в которой рассматриваются причины ошибок иного рода: ошибок, которые вызваны невнимательным отношением к подготовке анализа, непониманием его сути, а иногда просто игнорированием правил проведения опыта.*

*Вторая статья номера посвящена правилам постановки контролей, и ее можно рассматривать как продолжение основной статьи номера. Действительно, заметить ошибку и правильно понять ее причину можно только, опираясь на результаты, полученные в пробирках с контрольными растворами.*

Ситников А.

Ошибки, возникающие при проведении контрольных анализов можно разделить на две основные категории: ложноотрицательные результаты и ложноположительные результаты.

### ОШИБКИ ОПЫТА (ЛОЖНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ)

#### Ложноотрицательные результаты:

- Ингибирование реакции гелеобразования, вызванное специфическими свойствами испытуемого препарата;
- Нарушение условий хранения ЛАЛ-реактива;
- Нарушение условий хранения контрольного стандарта эндотоксина;
- Невысокая точность дозирования при приготовлении растворов;
- Плохое перемешивание растворов;
- Нарушение условий инкубирования;
- Ошибки при считывании результатов опыта.

#### Ложноположительные результаты:

- Усиление реакции гелеобразования, обусловленное специфическими свойствами испытуемого препарата;
- Плохая подготовка материалов;
- Привнесение загрязнений во время работы;
- Плохое качество воды, используемой для приготовления разведений.

Приведенная классификация позволяет систематизировать ошибки, но строго говоря, она не совсем верна. В действительности, ложными результатами называют результаты, при которых истинное содержание эндотоксинов маскируется ингибирующим действием препарата или, наоборот, сам препарат инициирует гелеобразование, что приводит к получению положительного результата при фактическом отсутствии эндотоксинов в растворе. Для таких результатов существует даже специальное определение, внешне несколько алогичное – «истинные ложноположительные/ложноотрицательные результаты». Другими словами, ложными результатами называются результаты, полученные в пробирках с испытуемым препаратом, не позволяющие точно оценить

содержание эндотоксина. В литературе понятия ложноотрицательные и ложноположительные результаты распространяются и на технические ошибки.

Вопросы ингибирования и усиления реакции со стороны испытуемого препарата заслуживают отдельного рассмотрения, и им может быть посвящена не одна статья. Далее в статье рассматриваются только технические ошибки, связанные с нарушением правил проведения теста.

### Ложноотрицательные результаты.

Ложноотрицательными результатами называются результаты, при которых в пробирках, где должен образоваться гель, геля не наблюдается. Примером ложноотрицательных результатов, вызванных техническими ошибками, могут служить пробирки с положительным контролем (раствором КСЭ в концентрации 2λ), в которых не произошло образования геля.

Возможные причины получения ложноотрицательных результатов:

1. Нарушение условий хранения ЛАЛ-реактива. Нарушение условий хранения может быть причиной разрушения белков лизата, что приводит к потере активности реактива. Лиофилизированный ЛАЛ-реактив нельзя долго хранить при температурах выше +8°C, ни в коем случае нельзя оставлять долго на свету (особенно на прямом солнечном свете). Свежеприготовленный раствор ЛАЛ-реактива хранят не более суток при температуре +4+8°C. В замороженном состоянии раствор ЛАЛ-реактива хранят от одного до трех месяцев. На практике это означает, что реактив после разведения либо должен быть использован в течение суток, либо сразу же заморожен. Режим заморозки от -10°C до -20°C в зависимости от рекомендаций производителя реактивов. Размораживать реактив можно только один раз. Условия хранения размороженного реактива такие же как и свежеразведенного, т.е. не более 24 часов при +4°C.

Интересно, что наиболее часто нарушаются именно эти, казалось бы, очень простые и исчерпывающие инструкции. Наиболее распространенная ошибка – после разведения реактив используют в течение одного - двух рабочих дней (одни сутки), храня в холодильнике при +4°C. Потом то, что осталось, замораживают в полной уверенности, что через неделю или месяц реактив можно будет использовать. В действительности, замораживается реактив, срок хранения которого согласно инструкции истек, поэтому рассчитывать на то, что он после разморозки будет «как новый» по меньшей мере наивно. Совсем уж недопустимым является хранение раствора

ЛАЛ-реактива в холодильнике неделями. Естественно, что за это время происходит полное разрушение белков лизата, и ни о какой реакции с эндотоксином говорить не приходится. Внимательно надо относиться и к запрету многократного повторения циклов замораживания/размораживания.

Замороженный ЛАЛ-реактив может быть разморожен только один раз и после этого должен быть использован. Остатки реактива повторно замораживать нельзя.

Конечно, условия хранения реактива вызывают потенциальную проблему – флакон с реактивом может не быть использован сразу, а какое количество реактива понадобится при следующей постановке опытов точно рассчитать трудно, соответственно, сложно решить на какие аликвоты делить свежеразведенный реактив для замораживания. Вообще, приемлемых решений этой проблемы два. Во-первых – попытаться так строить план работы, чтобы количество анализов в один день примерно соответствовало объему ЛАЛ-реактива во флаконе. Очевидно, что такой способ планирования работ не всегда возможен. Второй вариант выглядит более разумным, хотя и он не лишен недостатков. После разведения реактива та его часть, которая не используется, сразу переносится в пробирки для анализа (10x75 мм). В каждую пробирку добавляют по 100 мкл лизата, т.е. количество, необходимое для составления реакционной смеси. В этих же пробирках ЛАЛ-реактив и замораживают. Для этой цели очень хороши пробирки с крышками, однако можно обойтись и обычными пробирками, закрыв их парафильмом, фольгой и т.д. При следующей постановке опыта вынимают из холодильника столько пробирок, сколько необходимо для анализа, размораживают реактив и добавляют в пробирки испытуемый препарат и контрольные растворы. Недостатком этого способа является «перевернутая» схема составления реакционных смесей, при которой испытуемый раствор добавляется к ЛАЛ-реактиву, а не наоборот. Гораздо удобнее добавлять реактив в последнюю очередь. С помощью репетира или электронного дозатора можно в течение одной - двух минут внести реактив в 40-50 пробирок. Быстро же добавить к пробиркам с ЛАЛ-реактивом 40-50 разных растворов явно не получится. Поэтому этот метод хранения реактива хорош именно для лабораторий, в которых в день ставится по одному – два анализа.

Практика работы показывает, что ЛАЛ-реактив достаточно стабилен и может быть использован и за рамками сроков хранения, указанных в инструкциях. Однако, определить возможные допуски в правилах хранения можно только эмпирически и на свой страх и

риск. Разумнее все же не вносить усовершенствования в правила, написанные производителем реактива, а скрупулезно им следовать.

2. Нарушение условий хранения КСЭ. После разведения лиофилизированного КСЭ его можно хранить в холодильнике при +4°C в течение месяца. Флакон с КСЭ нельзя замораживать. Условия хранения достаточно простые, и если они и нарушаются, то нарушаются сознательно. Причина в том, что расходуется КСЭ медленно и к моменту истечения срока годности во флаконе еще остается значительное количество раствора. Поэтому нередко ситуации, когда раствор эндотоксина продолжают использовать, несмотря на то, что срок его хранения истек. Вообще говоря, причина ограничения срока хранения концентрированного раствора КСЭ не вполне ясна, ведь молекулы ЛПС очень стабильны, и даже в растворе они могут долго сохранять свои свойства. Возможно, основная причина ограничения срока годности – невозможность гарантировать стерильность вскрытого флакона даже при хранении его в холодильнике. Можно только посоветовать придерживаться рекомендаций производителя потому, что потеря активности КСЭ рано или поздно происходит и происходит сразу. Соответственно, опыт, в котором это выясняется, придется переставлять. Попутно можно будет оценить: оправдывает ли достигнутая экономия КСЭ потери, связанные с перестановкой анализа.

Очень часто нарушаются и правила работы с рабочими растворами КСЭ. Во всех инструкциях указывается, что рабочие растворы КСЭ, подготовленные для анализа, нельзя хранить. Каждый день их следует готовить заново. В данном случае мотивы ограничения срока годности вполне понятны – принимаются во внимание хорошие адгезивные свойства ЛПС. Молекулы эндотоксина адгезируются на поверхности пробирок, причем эта адгезия может быть необратимой, т.е. обратно в раствор молекулы уже не переходят, даже при хорошем перемешивании раствора. Для концентрированных исходных растворов КСЭ (концентрация от 20 ЕЭ/мл до 1000 ЕЭ/мл) эти потери можно игнорировать. Но для растворов с малыми концентрациями КСЭ, например: 0,06 ЕЭ/мл или 0,125 ЕЭ/мл, потери могут быть ощутимыми, и выражаться они будут в заметном снижении реальной концентрации эндотоксина в растворе и, соответственно, могут привести к получению ложноотрицательных результатов.

3. Невысокая точность дозирования при приготовлении растворов. На всех этапах приготовления разведений испытуемого препарата или КСЭ необходимо быть уверенным в том, что всегда отбираются и

перемешиваются объемы растворов, соответствующие расчетным. Механические дозаторы следует систематически проверять на точность дозирования. Градуировка стеклянных пипеток должна быть четкой.

Общие правила при подготовке разведений следующие.

1. При подготовке разведений не следует использовать слишком малые объемы разводимого раствора (менее 0,1 мл) из-за возможной ошибки при отборе пробы.

2. Не следует делать разведения с шагом более 1/10.

3. Если необходимо получить значительное разведение испытуемого препарата, то сначала делают разведения с шагом 1/10, затем переходят к разведениям с шагом 1/2. Возможны промежуточные варианты – разведения 1/4; 1/7; 1/8 и т.д.

Эти правила абсолютно логичны. С одной стороны, они гарантируют точность разведения, с другой, обеспечивают рациональный расход воды для ЛАЛ-теста. Проиллюстрировать эти утверждения можно, разобрав несколько вариантов решения простой задачи – подготовки разведения испытуемого препарата, например: до 1/64.

Вариант 1. Последовательные двукратные разведения (отношения объемов по 0,5 мл). Получается следующий ряд разведений:

Шаг разведений	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Объем воды для ЛАЛ-теста, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Необходимо 6 пробирок, используемых для подготовки разведений. Всего используется 3,0 мл воды для ЛАЛ-теста.

Вариант 2. Первое разведение с шагом 1/10, второе разведение дробное, для доведения до желаемого значения 1/64.

Шаг разведений	1/10	1/64
Объем воды для ЛАЛ-теста, мл	0,9	0,54

Необходимо всего две пробирки, используемые для подготовки разведений. Используется 1,44 мл воды для ЛАЛ-теста (отношения объемов в последнем разведении 0,1 мл+0,54 мл).

Вариант 3. Одно единственное разведение сразу до 1/64. При этом отношения объемов составят 0,1 мл препарата и 6,3 мл воды для ЛАЛ-теста. Этот способ требует большого расхода воды для ЛАЛ-теста. Уменьшать же объем разводимого препарата, например до 0,01 мл, не рекомендуется, поскольку значительно возрастает риск ошибки, связанной с точностью отбора пробы.

Из перечисленных вариантов довольно часто используется первый, он обеспечивает

наибольшую точность разведений и может быть вполне приемлемым, когда надо приготовить разведение в 4-8 раз. Если же необходимо приготовить разведение препарата в 100 или 1000 раз, то естественно, целесообразней будет второй вариант. Последний вариант подготовки разведений, пожалуй, самый нерациональный, но иногда и он доводится до совершенного абсурда. Встречаются методики, в которых для приготовления разведения испытуемого препарата в 100 раз рекомендуется смешать 1 мл препарата с 99 мл воды для ЛАЛ-теста!

**4. Плохое перемешивание растворов.** При подготовке разведений надо принимать во внимание особенности поведения молекул эндотоксина в растворах. Молекулы эндотоксина обладают одновременно гидрофобными и гидрофильными свойствами. В водном растворе молекулы эндотоксина притягиваются друг к другу, образуя мицеллы. Если в растворе присутствуют положительно заряженные ионы, то вокруг них формируются еще более крупные агрегаты. Необходимо быть уверенным в том, что эти агрегаты равномерно диспергированы в растворе. Иначе может оказаться, что в объеме, который отбирается из раствора КСЭ для подготовки следующего разведения, может содержаться непропорционально малое количество эндотоксина. Конечно, не следует думать, что в случае какой-то сложной физической флуктуации все молекулы эндотоксина могут собраться, например, на дне пробирки, а 4/5 раствора будет вообще свободно от эндотоксина. Но учитывать особенности поведения молекул эндотоксина в растворе необходимо. Особенно это важно, когда проверяются растворы испытуемого препарата, например, при подготовке контроля ингибирования, так как диспергировать эндотоксин в растворе препарата бывает труднее, чем в воде. Не случайно поэтому во всех инструкциях по работе с ЛАЛ-реактивом настоятельно рекомендуется перемешивать каждый раствор на вихревой мешалке не менее 10-30 секунд. Перемешивание рекомендуется делать на максимальной скорости и сразу после перемешивания отбирать аликвоты для приготовления следующего разведения. Если подготовленные растворы используются не сразу, перед постановкой анализа их надо снова перемешать.

**5. Нарушение условий инкубирования.** Прежде чем перейти к разбору ошибок, возможных при проведении инкубирования, необходимо обратить внимание на следующее обстоятельство. Считается, что инкубирование начинается с момента помещения пробирок в водяную баню, но, в действительности, реакция начинается сразу после добавления ЛАЛ-реактива к испытуемому раствору. И,

хотя при комнатной температуре реакция идет медленно, интервал между добавлением ЛАЛ-реактива в первую и последнюю пробирки должен быть минимальным.

Оборудование, используемое для проведения инкубирования, должно гарантированно обеспечивать температуру +37°C с допустимыми колебаниями  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Особенно важно, какая температура поддерживается в самой реакционной смеси внутри пробирки. Проверить это можно, поместив термометр непосредственно в пробирку, заполненную водой. Конструкция штативов должна обеспечивать эффективную теплопередачу пробиркам.

В качестве устройства для проведения инкубирования могут с равным успехом использоваться водяная баня или твердотельный термостат – термоблок. К сожалению, довольно распространена практика проведения инкубирования в воздушном термостате, поскольку эти термостаты есть в каждой микробиологической лаборатории. Проведение инкубирования в воздушном термостате потенциально опасно, главным образом, в виду того, что нагрев реакционных смесей до +37°C достигается значительно медленнее, к тому же при открытии и закрытии двери происходит снижение температуры в камере. Поэтому при проведении инкубирования в шкафу нельзя быть уверенным в том, что температура реакционной смеси поддерживается на уровне 37°C в течение всего часа. Все это часто приводит к получению отрицательных результатов в пробирках с контролем эндотоксина, и соответственно, чревато получением недостоверных результатов в пробирках с испытуемым препаратом.

При проведении инкубирования следует оберегать реакционные смеси от сотрясений или толчков. Гель, особенно в процессе формирования, очень хрупок и может быть необратимо разрушен случайным ударом или вибрацией. Строго говоря, любые движения или действия, выполняемые рядом с инкубируемыми реакционными смесями, можно рассматривать как потенциально опасные. Нельзя также использовать водяные бани с принудительной циркуляцией воды. Баню нельзя размещать вблизи источников вибрации, например, рядом с холодильником или на одном столе с вихревой мешалкой, нельзя трогать, двигать баню с пробирками. Не следует вынимать пробирки из бани до окончания инкубирования.

**6. Ошибки при считывании результатов опыта.** По окончании инкубирования следует аккуратно вынимать пробирки и переворачивать их на 180° одним плавным движением. В некоторых инструкциях на ЛАЛ-реактив делается акцент на то, что плотный

гель - это гель, который не разрушается при плавном однократном переворачивании пробирки на 180° и который удерживается на дне в течение хотя бы 2-3 секунд. Из этого следует, что результаты записывать надо сразу после их оценки. Не стоит рассчитывать на то, что пробирки с результатами можно будет через полчаса - час показать еще кому-нибудь, повторив процедуру их переворачивания. Считывание результатов следует проводить в той же последовательности, что и добавление ЛАЛ-реактива к испытуемым растворам: если сначала добавили реактив к контролям, потом к испытуемому препарату, то и начинать надо с пробирок с контролем и т.д. Пробирки следует вынимать из бани по одной, стараясь не задеть о край штатива и о другие пробирки. Не следует протирать пробирки или стряхивать с них капли воды, это может привести к необратимому разрушению геля.

Наиболее сложными в оценке бывают промежуточные результаты, когда в пробирках гель образовался, но он разрушился при ее переворачивании. Причиной может быть концентрация эндотоксина, очень близкая к чувствительности ЛАЛ-реактива, но недостаточная для образования твердого геля, а может быть неловкое движение при переворачивании пробирки или дрожание руки. Иногда разобраться можно только по результатам второй повторности. В определенных случаях такой ошибкой можно пренебречь, при этом постараться определить для себя ее причину. В том случае, если такие промежуточные результаты получены для испытуемого препарата или положительного контроля испытуемого препарата, опыт, безусловно, должен быть повторен.

### **Ложноположительные результаты.**

Ложноположительными результатами называются результаты, когда в пробирках, в которых не должно происходить образование геля, образуется плотный гель. Примером ложноположительных результатов, вызванных техническими ошибками, могут служить пробирки с отрицательным контролем (вода для ЛАЛ-теста), в которых произошло образование геля.

Возможные причины получения ложноположительных результатов.

1. Плохая подготовка материалов. К подготовке материалов, осуществляемой пользователем перед проведением анализа, можно отнести подготовку стеклянной посуды – пробирок для разведений, пипеток и т.д. В такой подготовке исключительно важное значение имеет финишная депирогенизация посуды. Чистую и сухую стеклянную посуду заворачивают в несколько слоев в

алюминиевую фольгу. Упаковки депирогенизируют в сухожаровом шкафу при температуре +250°C в течение 30 минут. Менее надежным считается режим +180°C, в этом случае обработка должна занимать не менее трех часов. Следует отметить, что использование разовой посуды не только снижает риск привнесения загрязнений в реакционную смесь, но и исключает необходимость проведения предварительной подготовки материалов, что значительно упрощает работу.

2. Привнесение загрязнений во время работы. Вопреки распространенному мнению для проведения ЛАЛ-теста не нужны специальные боксы и, тем более, ламинарные шкафы. Анализ может быть проведен в обычной химической лаборатории. Возможность привнесения загрязнений в реакционные смеси из воздуха минимальна, однако не следует располагать рабочее место в зоне постоянных воздушных потоков (работающие кондиционеры, вентиляторы и т.д.). Флаконы с ЛАЛ-реактивом, КСЭ, водой для ЛАЛ-теста следует закрывать лабораторной пленкой «Парафилм».

Наиболее вероятной причиной привнесения загрязнений в реакционные смеси могут быть стеклянные пипетки или наконечники для автоматических пипеток, чистота которых не соответствует требованиям. Не рекомендуется повторное использование мытых пластиковых наконечников для автоматических дозаторов. Даже если эти наконечники выдерживают цикл автоклавирования. При приготовлении разведений нельзя использовать одну и ту же пипетку или наконечник для дозирования разных растворов, например, растворов КСЭ и испытуемого препарата.

3. Плохое качество воды, используемой для приготовления разведений. При подготовке растворов для анализа должна использоваться вода для ЛАЛ-теста. Отбор воды необходимо делать чистой апиrogenной пипеткой, всячески избегая внесения загрязнений во флакон с водой. Вскрытый флакон с водой хранят в холодильнике. Тем не менее, даже в холодильнике качество воды может ухудшаться. Срок использования вскрытого флакона с водой должен быть минимальным, поскольку определенных рекомендаций по срокам хранения вскрытого флакона дать невозможно.

В целом, вода для ЛАЛ-теста отличается от воды для инъекций только тем, что в ней содержание эндотоксинов значительно ниже определяемого в тесте уровня. Квалификация «Вода для ЛАЛ-теста» присваивается серии стерильной воды для инъекций после проведения соответствующей проверки. Очевидно, что проверять качество воды следует с помощью наиболее

чувствительных методов проведения анализа, например, с помощью кинетического турбидиметрического метода. Это и делают производители ЛАЛ-реактива, указывая после проверки содержание эндотоксинов во флаконе с водой. Например, содержание эндотоксинов менее 0,001 ЕЭ/мл или менее 0,005 ЕЭ/мл. При этом вода с содержанием эндотоксинов менее 0,005 ЕЭ/мл ни чуть не хуже воды с содержанием эндотоксинов менее 0,001 ЕЭ/мл. Разница в цифрах не должна вводить в заблуждение, она отражает только разрешающую способность метода, использованного для проверки. В действительности, эти цифры означают, что в воде для ЛАЛ-теста содержание эндотоксинов настолько мало, что их нельзя обнаружить с помощью самых чувствительных методов проведения анализа.

### Заключение

Перечисленный список технических ошибок получился весьма обширным, но

далеко не исчерпывающим. Список этот открыт, особенно в части «злостных» нарушений правил проведения анализа. Очень часто все мы в своей повседневной работе прилагаем серьезные усилия для того, чтобы этот список не кончался. Бесконечные попытки «улучшить» правила проведения анализа, как правило, приводят к необходимости переставлять опыт и добавляют еще один – два пункта к списку ошибок. Поэтому, прежде чем вносить очередное улучшение, стоит задуматься о том, что важнее: внести сомнительное усовершенствование или получить гарантированно достоверный результат.

Конечно, вносить изменения в собственные методики проведения анализа можно и нужно, но при этом сначала следует подумать: зачем это делается, и даст ли это сколько-нибудь заметный экономический эффект; затем отработать измененную методику; валидировать ее; и только после этого вводить модифицированный метод в практику повседневной работы.

## Постановка контролей при проведении гель-тромб теста.

Чиркова М.Н., Ситников А.Г.

При проведении даже самого простого анализа, качественного гель-тромб теста, большая часть материалов расходуется на постановку контролей. Качественный анализ представлен 8 пробирками: анализ испытуемого образца - всего две пробирки (две повторности), остальные шесть пробирок - это три контроля (каждый в двух повторностях). Такое количество контролей может показаться расточительством, но постановка этих контролей и определяет корректность всего опыта.

**Табл. 1.** Схема постановки качественного анализа и назначение контролей.

Повторности	П	П+	К-	К+
1	-	+	-	+
2	-	+	-	+
	Испытуемый препарат	Положительный контроль испытуемого препарата	Отрицательный контроль	Положительный контроль

Отрицательный контроль представляет собой реакционную смесь: ЛАЛ-

реактив + вода для ЛАЛ-теста. В результате реакции в реакционной смеси не должно происходить никаких видимых изменений. Назначение этого контроля - демонстрация того, что все реактивы, вода и прочее оборудование, используемое для подготовки анализа, не содержат эндотоксинов в определяемых в тесте количествах.

**Положительный контроль** представляет собой реакционную смесь: ЛАЛ-реактив + раствор КСЭ в концентрации 2Л. Эта концентрация эндотоксина должна гарантированно вызывать образование геля. Назначение контроля - демонстрация того, что реактивы (ЛАЛ-реактив, КСЭ) не утратили своих свойств, и условия проведения реакции соответствуют стандартным условиям проведения реакции.

**Положительный контроль испытуемого образца.** Он представляет собой испытуемый препарат (или его разведение), к которому добавлен эндотоксин в концентрации 2Л. Этот контроль нужен для того, чтобы убедиться в том, что испытуемый препарат не оказывает ингибирующего влияния на ход реакции. Ранее этот контроль называли «контролем ингибирования».

Этот контроль занимает особое место и отличается от «обычных контролей». Так, например, при проведении анализов нескольких препаратов одновременно отрицательный и положительный контроли

могут быть общими, в то время как положительный контроль испытуемого образца должен ставиться для каждого из проверяемых препаратов. В настоящей статье мы коснемся вопросов постановки общих контролей.

Поскольку отрицательный контроль - это вода для ЛАЛ-теста и ЛАЛ-реактив, то подготовка этого контроля не представляет особых сложностей. Надо только иметь в виду, что проверяться должна вода, которая используется для подготовки разведений, а не вода из специально сохраняемого эталонного флакона. Все-таки назначение отрицательного контроля - подтверждение того, что растворитель, используемый для подготовки разведений, не содержит эндотоксинов в определяемых в тесте количествах.

Варианты постановки положительного контроля и способы его подготовки намного более разнообразны. Прежде, чем перейти к обсуждению плана постановки положительных контролей и способов его подготовки, необходимо сделать небольшой экскурс в историю становления сложившейся ныне системы постановки положительных контролей.

В самой первой фармакопейной статье (Фармакопея США XX издания) в описании правил проведения геле-трома теста не было деления на качественный и количественный анализы. В качестве положительного контроля использовалась серия разведений КСЭ от 0,25λ до 2λ. Контроль в таком виде должен был ставиться при проведении каждого опыта. Позже появился еще один документ, регламентирующий правила постановки анализа, - «Руководство по валидации ЛАЛ-теста», в котором указывалось, что если в лаборатории при постановке опытов постоянно получают адекватные результаты для серии разведений КСЭ, то при проведении нескольких анализов в течение рабочего дня можно ставить серию разведений КСЭ только для первого инкубирования. В остальных опытах эту серию можно заменить одной точкой - раствором КСЭ в концентрации 2λ. Когда появилась первая редакция статьи «Бактериальные эндотоксины» Европейской фармакопеи, то в ней было введено деление на качественный и количественный анализы. С количественным анализом осталась серия разведений КСЭ, а качественному анализу достался положительный контроль в виде раствора КСЭ в концентрации 2λ.

Конечно, результаты анализа серии разведений КСЭ являются исчерпывающими, поскольку они позволяют рассчитать чувствительность ЛАЛ-реактива в условиях проведения опыта. Серьезным недостатком является высокая затратность опыта по реактивам, даже несмотря на то, что он

проводится в двукратной повторности. Контроль в виде раствора КСЭ с концентрацией 2λ выглядит более рациональным, зато он менее информативен. Сегодня оба эти варианта постановки контролей используются в равной степени. В свете представлений о правильной организации опытов серия КСЭ ставится только один раз в начале рабочего дня, все остальные анализы, качественные и количественные, проводятся с раствором КСЭ с концентрацией 2λ. Таким образом соблюдается положение о необходимости постоянной проверки работоспособности ЛАЛ-реактива и расходуется не очень большое количество реактивов.

Правила подготовки серии разведений КСЭ точно такие же, как и правила подготовки разведений эндотоксина при проведении опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Сначала концентрация КСЭ доводится до 1 ЕЭ/мл, затем разведения продолжают с шагом 1/2 до получения нужного диапазона в зависимости от чувствительности ЛАЛ-реактива. Разведения КСЭ делаются в пробирках для разведений и затем переносятся в пробирки для анализа. Готовится такая серия обычно один раз в начале рабочего дня. При ее подготовке можно учитывать и план проведения следующих опытов, подготовив растворы КСЭ с концентрацией 4λ или 20λ.

При проведении последующих экспериментов в качестве положительного контроля используется раствор эндотоксина с концентрацией 2λ. Такой контроль может быть подготовлен разными способами, в том числе и с помощью раствора КСЭ с концентрацией 20λ. Готовится такой контроль непосредственно в пробирках для реакции: к 100 мкл воды для ЛАЛ-теста добавляют 10 мкл раствора КСЭ с концентрацией 20λ. Как правило, этот способ используется для подготовки положительного контроля испытуемого образца, но он же может быть использован для подготовки обычного положительного контроля. Способ этот имеет как преимущества, так и недостатки. К преимуществам можно отнести то, что такая операция требует минимум времени и сокращает количество промежуточных растворов, которые готовятся в пробирках для разведений. Недостатком является риск получения ложноотрицательного результата в случае не точного отбора очень маленького объема раствора КСЭ.

Резюмируя часть, касающуюся постановки положительных контролей, необходимо еще раз обратить внимание на следующее.

1. Положительным контролем может называться и серия из 4 последовательных двукратных разведений КСЭ (концентрации

2λ, λ, 0,5λ, 0,25λ), и раствор в концентрации 2λ.

2. Серию КСЭ можно ставить один раз в течение рабочего дня, во всех последующих анализах положительный контроль может быть представлен только раствором эндотоксина в концентрации 2λ.

3. Положительный контроль ставится всегда в двух повторностях.

Иногда положительный контроль в виде стандартной серии разведений КСЭ называют подтверждением заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. И хотя, по сути, это верно, но все же следует соблюдать терминологию, принятую в ОФС «Бактериальные эндотоксины». Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива - это самостоятельный анализ с четко оговоренными условиями проведения и

повторения. В то время как положительный контроль является фрагментом, важной составной частью качественного и количественного анализов и анализа «Мешающие факторы».

#### **Заключение**

Назначение контролей заключается в подтверждении, что тест-система работает правильно, и полученным результатам можно верить. Это практический ответ. Теоретически, нам это все известно заранее: проводя опыт, мы предполагаем, что вода для ЛАЛ-теста - чистая, ЛАЛ-реактив - работоспособный, опыт проводится по стандартным условиям, которые много раз были проверены. Но эта уверенность не дает нам права отказываться от постановки контролей вообще.

#### **Подписка**

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

Бюллетень распространяется бесплатно. Номера высылаются подписчикам по почте. Для оформления подписки необходимо оформить заявку с указанием названия организации, почтового адреса, фамилии и должности подписчика.

Просим отправлять заявки по почте: 117105, г. Москва, ул. Нагатинская, 3а, ООО «ЛАЛ-Центр».

**Тел.: (095) 517-40-37, факс: (095) 742-83-49, E-mail: LALNews@Limulustest.ru**

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

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: 30.04.2005 г.

Формат: А4; Бумага: супербелый лен 90 г/м<sup>2</sup>; 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