

Анализ «Мешающие факторы» в гель-тромб тесте и в фотометрических методах. Неявные отличия при едином целеполагании.

Демидова В.В., Ожерельева А.С.

Введение

Анализ «Мешающие факторы» – основной валидационный анализ, с его помощью можно показать, что в испытуемом лекарственном препарате возможна оценка концентрации эндотоксинов с приемлемым для используемого метода уровнем точности.

В ОФС «Бактериальные эндотоксины» действующего издания ГФ РФ есть два больших раздела: гель-тромб тест и фотометрические методы. В этих разделах рассматриваются две схемы проведения этого анализа – «Мешающие факторы». Одна схема реализуется при проведении проверки содержания бактериальных эндотоксинов с помощью гель-тромб теста, вторая – универсальная схема для всех фотометрических анализов (инструментальных, количественных анализов).

Эти варианты постановки одинаковые по назначению, но очень разные по способам проведения, требованиям к образцам и по вариантам оценки результатов. Ниже приводятся примеры из практики нашей лаборатории с описанием двух схем постановки анализа «Мешающие факторы» и разбором плюсов и минусов каждого варианта.

Постановка задачи

Необходимо провести валидацию для лекарственного препарата, представляющего собой раствор для инъекций. Значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов (ПСБЭ) для этого препарата – менее 11,76 ЕЭ/мл.

Валидацию необходимо провести методами А и С. Таким образом каждым методом необходимо провести по три анализа «Мешающие факторы» для данного лекарственного препарата.

Для проведения валидации предоставлены три серии с условными номерами: 1, 2 и 3.

1. Проведение анализа «Мешающие факторы» в гель-тромб тесте, метод А

Задача анализа «Мешающие факторы» – показать, что эндотоксин может быть обнаружен (измерен) в растворе препарата. Это модельный опыт, для его проведения к препарату добавляют эндотоксин в известной концентрации, и эта концентрация должна быть

зарегистрирована в опыте. В гель-тромб тесте все расчеты построены вокруг чувствительности ЛАЛ-реактива (лизата амебоцитов), которая обозначается λ . Лизат реагирует с концентрациями, равными или больше λ , и не реагирует с концентрациями эндотоксина меньше λ . Соответственно в опыт надо поставить раствор препарата с несколькими концентрациями контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), близкими к чувствительности лизата. Если учитывать стандартно допустимое колебание чувствительности лизата, то положительный результат может быть получен для концентраций 0.5λ , λ или 2λ и точно не должен быть получен для концентрации КСЭ равной 0.25λ . В этом ряду концентраций по результатам опыта должен быть зарегистрирован хоть один обязательный плюс (для 2λ) и обязательный минус (хотя бы для 0.25λ).

Анализ получается довольно громоздким, в сущности, это четыре одновременно поставленных качественных анализа, для каждого из которых ответ может быть либо да, либо нет, в целом же за результат опыта принимается положительный результат для самой низкой концентрации, для которой получен плотный гель.

Граничные условия проведения анализа «Мешающие факторы» (МФ) в гель-тромб тесте:

- Необходимо подобрать разведение препарата, в котором он не ингибирует реакцию лизата амебоцитов с эндотоксином;
- В выбранном разведении испытуемого препарата не должно быть значительного содержания естественных (природных) бактериальных эндотоксинов, их присутствие может затруднить или даже сделать невозможным проведение определения добавленной концентрации КСЭ.

С учетом этих граничных условий, построена и последовательность подготовки и проведения валидации в гель-тромб тесте:

- Рассчитываем значение ПСБЭ, определяем максимально допустимое разведение (МДР) для испытуемого препарата;
- В серии опытов с разными разведениями до МДР включительно оцениваем возможность ингибирования и наличие/отсутствие эндотоксинов;
- Выбираем наиболее подходящее разведение для проведения анализа МФ, при возможности существенно ниже МДР или $1/2$ МДР;
- Проводим анализ «Мешающие факторы» для 3-х разных серий испытуемого препарата.

Ниже приведены обобщенные результаты такой работы, проделанной для исследуемого лекарственного препарата.

В работе использовали лизат амебоцитов – ЛАЛ-реактив для гель-тромб теста с заявленной чувствительностью (λ), равной 0,03 ЕЭ/мл (полное математическое значение чувствительности 0,03125 ЕЭ/мл).

Для проверяемого лекарственного препарата МДР равно:

$$МДР = \frac{11,76 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 376$$

На первом этапе работы оценивалась возможность проявления ингибирования реакции со стороны испытуемого препарата и содержание бактериальных эндотоксинов в проверяемых сериях. Для этого каждую представленную серию проверяли сначала в разведениях 1/1; 1/10; 1/100 и 1/376. Для каждого разведения ставили положительный контроль испытуемого образца, в котором концентрация КСЭ составляла 2 λ . В таблице №1 приведены данные, полученные для серии №1, для всех остальных серий были получены аналогичные результаты.

Таблица №1. Результаты предварительных анализов для серии №1 испытуемого лекарственного препарата.

	1/1	1/10	1/100	1/376
П	--	++	++	--
П+	--	++	++	++

По результатам предварительных исследований всех 3-х серий испытуемого лекарственного препарата сделаны следующие общие выводы:

1. Исходный раствор препарата ингибирует реакцию. Начиная с разведения 1/10, ингибирование преодолевается и наблюдается образование геля.
2. В 3-х проверенных сериях испытуемого лекарственного препарата регистрируется наличие бактериальных эндотоксинов, как минимум до разведения 1/100. Таким образом содержание БЭ во всех 3-х сериях: более или равно 3,125 ЕЭ/мл ($0,03125 \cdot 100 = 3,125 \text{ ЕЭ/мл}$).
3. В разведении 1/376, равном МДР, результат отрицательный, т.е. в каждой проверенной серии содержание естественных эндотоксинов ниже значения ПСБЭ.

Таким образом, во всех проверяемых сериях было зарегистрировано наличие эндотоксинов и эти «свои» эндотоксины могут серьезно помешать определению концентрации добавленного КСЭ при постановке анализа «Мешающие факторы». Принято

решение провести анализ МФ в максимально допустимом разведении, в котором эндотоксины уже не регистрировались. К сожалению, все 3 анализа оказались неудачными. Пример результатов одного такого анализа приведен в таблице №2.

Таблица №2. Результаты анализа «Мешающие факторы» для серии №1 испытуемого лекарственного препарата.

Повторности	Разведение ЛС и концентрация КСЭ				Контроль ЛС
	1/376 2λ	1/376 λ	1/376 0,5λ	1/376 0,25λ	1/376 (К)
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-

Результаты характерные, мы такие получали не один раз. В контроле по препарату (разведение 1/376) результат отрицательный. Во всех разведениях, к которым был добавлен КСЭ результаты оказались положительными. Даже для концентрации КСЭ равной 0.25λ.

В данном случае фоновая концентрация естественного эндотоксина, содержащегося в лекарственном препарате, мешает определению добавленной концентрации КСЭ.

Следует отметить, что если анализ возможно было бы провести в разведении 1/500, или еще лучше в разведении 1/1000, то для этих серий скорее всего получили бы адекватные результаты в МФ.

Вывод по проведенной серии экспериментов – проверка эндотоксинов в лекарственном препарате возможна, ингибирование снимается, начиная с разведения 1/10. Валидацию метода А можно провести в разведениях меньших МДР (что рекомендуется), но для проведения валидации следует подобрать другие серии лекарственного препарата, в которых нет или низкое фоновое содержание естественных эндотоксинов. Представленные серии использовать для валидационных опытов невозможно.

2. Проведение анализа «Мешающие факторы» в фотометрических методах (методы С, D, E, F).

В кинетических анализах проведение анализа «Мешающие факторы» намного проще. К раствору препарата добавляется одна, известная концентрация КСЭ, которая затем и определяется в опыте по стандартной калибровочной кривой. Измеренное содержание сравнивается с опорным (известным, добавленным) значением и степень восстановления добавленной концентрации КСЭ выражается в процентах. Критерии приемлемости в этом

анализе – измеренная концентрация должна быть в пределах 50% - 200% от ожидаемой величины. Обычно в положительный контроль добавляют КСЭ до концентрации, примерно равной середине калибровочной кривой. Так если в опыте ставится калибровочная кривая 0,05ЕЭ/мл - 5ЕЭ/мл или 0,005ЕЭ/мл - 5ЕЭ/мл, то добавленная концентрация должна быть равна 0,5ЕЭ/мл.

Граничных условий по подбору образцов для МФ в фотометрических анализах, пожалуй, нет, кроме непревышения уровня ПСБЭ по содержанию бактериальных эндотоксинов в валидационных сериях.

Конечно, в опыт ставится такое разведение препарата, в котором ингибирование не проявляется. Используя опыт проверки, полученный в гель-тромб тесте, было решено поставить анализ для всех проверяемых серий в разведении 1/100. Это разведение меньше МДР, которое для калибровки 0,005ЕЭ/мл – 5ЕЭ/мл (λ равна 0,005 ЕЭ/мл) составляет:

$$MDP = \frac{11,76 \text{ ЕЭ/мл}}{0,005 \text{ ЕЭ/мл}} = 2352$$

По данным гель-тромб теста можно ожидать, что ингибирование и в методе С будет незначительным. Содержание же естественных эндотоксинов в данном опыте не должно быть препятствием для оценки добавленной концентрации КСЭ в положительном контроле. Ниже приводится фрагмент лабораторного протокола из ПО Endoscan-V:

Рис. 1. Фрагмент протокола анализа с результатами анализов «Мешающие факторы» для серий №№ 1 - 3.

Group	Name	Lot Number	Reaction Time	CV%	CV < 20%	Endotoxin Value	Spike Rcvy %
SPL6	_1	N/A	1626,0; 1719,0	2,78	VALID	6,5112 EU/mL	
SPK6			1035,0; 1057,5	1,08	VALID	0,5274 EU/mL	92
SPL7	_2	N/A	1841,3; 1860,0	0,51	VALID	4,1464 EU/mL	
SPK7			1063,5; 1056,0	0,35	VALID	0,4981 EU/mL	91
SPL8	_3	N/A	1710,0; 1788,8	2,25	VALID	5,3289 EU/mL	
SPK8			1061,8; 1070,8	0,42	VALID	0,4846 EU/mL	86

Пояснения к протоколу:

Строки по горизонтали:

SPL№ - Код образца на карте планшета.

SPK№ - Код положительного контроля каждого образца.

Name (_1 – _3) - Коды проверенных серий.

Колонки по вертикали:

Endotoxin value в строке SPL – концентрация естественного эндотоксина в образце (в пересчете на исходный раствор).

Endotoxin value в строке SPK – измеренная концентрация КСЭ в положительном контроле испытуемого образца.

Spike Recovery% - степень восстановления концентрации КСЭ в положительном контроле.

По результатам видно, что естественные эндотоксины были обнаружены во всех 3-х сериях, что, собственно, и ожидалось. Содержание естественных эндотоксинов во всех 3-х сериях примерно в 2 раза ниже установленного для лекарственного препарата ПСБЭ. Данные, полученные в методе С прекрасно соответствуют результатам, полученным в методе А.

Восстановление концентрации КСЭ в положительных контролях по каждой серии составило 91%, 92% и 86%. Это очень хорошие результаты, можно считать, что в разведении 1/100 ингибирования в кинетическом турбидиметрическом методе уже не наблюдается.

Таким образом, валидировать методику проверки эндотоксинов методом С удалось с первого раза. Да, во всех поставленных в опыт сериях присутствуют естественные эндотоксины, однако это не мешает количественно измерить концентрацию добавленного КСЭ.

Для лучшего понимания возможностей количественных оценок эндотоксинов, которые предоставляют количественные фотометрические методы, имеет смысл детально рассмотреть данные, представленные в протоколе.

В лабораторном протоколе, сгенерированном прикладной программой Endoscan-V, мы видим уже обработанные первичные данные. Возможно, что с первого взгляда не все может быть понятно. Например, данные в протоколе для образца _1:

Содержание эндотоксинов в образце: 6,5112 ЕЭ/мл

Содержание эндотоксинов в положительном контроле: 0,5274 ЕЭ/мл

Степень восстановления концентрации КСЭ в контроле: 92%

Может показаться непонятным, почему в положительном контроле, в который добавили КСЭ до 0.5ЕЭ/мл, измеренная концентрация эндотоксинов оказалась равной 0,5274 ЕЭ/мл, и это составляет всего 92% от ожидаемой величины.

Измеренное значение концентрации эндотоксинов в положительном контроле теоретически и практически представляет собой сумму концентрации естественного эндотоксина и концентрации добавленного КСЭ. Для образца _1 содержание эндотоксинов в исходном растворе составило 6,5112 ЕЭ/мл, но поскольку проверку мы проводили в разведении 1/100, то в проверяемом растворе концентрация была равна 0,0651 ЕЭ/мл. В положительном контроле к этому разведению еще и добавили 0,5 ЕЭ/мл КСЭ. В опыте в положительном контроле получилась концентрация равная 0,5274 ЕЭ/мл, это свои

эндотоксины плюс КСЭ. Если из общей суммы (0,5274 ЕЭ/мл) вычесть долю естественных эндотоксинов (0,0651 ЕЭ/мл), получим значение измеренной в опыте (восстановленной) концентрации КСЭ, равное 0,4623 ЕЭ/мл. Это значение как раз и составляет 92% от ожидаемой величины в 0,5 ЕЭ/мл.

Последовательность оценки степени восстановления концентрации КСЭ в опыте следующая:

<i>Концентрация БЭ, измеренная в положительном контроле</i>	<i>0,5274 ЕЭ/мл</i>
<i>Концентрация естественных эндотоксинов в разведении препарата 1/100</i>	<i>0,0651 ЕЭ/мл</i>
<i>Восстановленная концентрация КСЭ</i>	<i>0,4623 ЕЭ/мл</i>
<i>(измеренная концентрация – концентрация естественных эндотоксинов)</i>	
<i>(0,5274 ЕЭ/мл– 0,0651 ЕЭ/мл)</i>	
<i>Ожидаемая концентрация КСЭ</i>	<i>0,5 ЕЭ/мл</i>
<i>Значение восстановленной концентрации КСЭ в процентах</i>	<i>92%</i>

Подобным образом можно пересчитать и значения концентрации в положительном контроле образца (РРС) для остальных серий.

Таблица 3. Измеренные значения концентраций эндотоксинов в РРС и пересчет с учетом фонового содержания естественных эндотоксинов.

Номер серии/образец	БЭ в исходном растворе, ЕЭ/мл	БЭ в разведении 1/100, ЕЭ/мл	РРС, ЕЭ/мл	РРС после вычета естественных эндотоксинов, ЕЭ/мл	Ожидаемое значение концентрации и в РРС, ЕЭ/мл	Расчетное значение восстановления КСЭ, %
1 / №1	6,5112	0,0651	0,5274	0,4623	0,5	92,5%
2 / №2	4,1464	0,0415	0,4981	0,4566	0,5	91,3%
3 / №3	5,3289	0,0533	0,4846	0,4313	0,5	86,3%

Отметим, что результаты положительных контролей образца не только показали хорошие значения восстановления концентрации КСЭ, но и в какой-то степени дублируют результаты по образцу. Получается, такое подтверждение результатов, полученных для образцов, и, что важно, наличие естественных эндотоксинов – не мешает проведению валидационного опыта.

Заключение

Общие выводы. В гель-тромб тесте и фотометрических методах в анализе МФ оценивается возможность регистрации эндотоксинов в растворе лекарственного препарата. В ГТТ используется единственно доступная схема, аналогичная оценке чувствительности ЛАЛ-реактива. Проверяется способность лизата амебоцитов (ЛАЛ-реактива) реагировать с

несколькими разными концентрациями КСЭ. На проведение опыта очень сильно влияет содержание естественных эндотоксинов в проверяемых сериях.

В фотометрических методах для проведения анализа МФ достаточно проверить всего один раствор лекарственного препарата – одно разведение, в котором не ожидается ингибирование и к которому будет добавлена известная концентрация КСЭ. В кинетических анализах проведение такого опыта и проще, и полученные результаты оказываются много более информативными, чем результаты гель-тромб теста.