



Использование индикаторов эндотоксина для валидации термической депилогенизации

Депилогенизацией называют процедуру устранения или разрушения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Наиболее надежным способом депилогенизации является термическая депилогенизация при температуре 250°C не менее 30 минут. Проводят термическую депилогенизацию в сухожаровых шкафах и в стерилизационных туннелях, в которых проводится обработка мытых флаконов или ампул перед розливом. Депилогенизация считается эффективной в том случае, если она приводит к снижению концентрации эндотоксинов как минимум в 1000 раз (3 log).

Для оценки эффективности способа удаления/разрушения эндотоксинов используются специальные препараты эндотоксина – индикаторы эндотоксина. При термической депилогенизации используют индикаторы эндотоксина для прямой валидации. Они не требуют специальной предварительной подготовки, флаконы с эндотоксином помещают непосредственно в валидируемое оборудование.

Для проверки процедуры депилогенизации несколько флаконов индикаторов эндотоксина подвергают депилогенизации и после этого определяют в этих флаконах содержание эндотоксинов. Полученное значение сравнивают с содержанием эндотоксинов в необработанных (контрольных) флаконах.

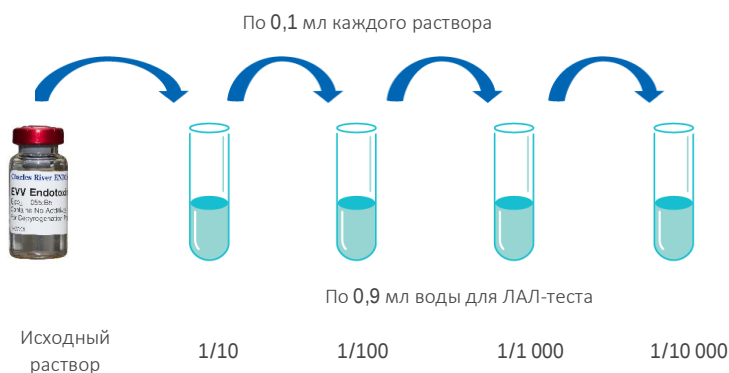


Варианты оценки содержания эндотоксинов. В инструкции на индикаторы эндотоксина производитель указывает, что лучше всего для оценки снижения активности эндотоксина

подходят кинетические анализы. Мы хотели показать, что проверка не менее успешно может быть проведена и с помощью привычного гель-тромб теста. Ниже приведен пример использования самого простого и доступного метода определения – **качественного гель-тромб теста** для оценки эффективности процесса депирогенизации.

Флаконы с индикаторами эндотоксина. В Сертификате активности, который выдает компания-производитель, указываются, его примерная активность, например 10 000 ЕЭ/флакон. Исходная активность эндотоксинов и активность после депирогенизации определяется пользователем доступным методом проведения анализа. Согласно инструкции в обработанные и в необработанные (контрольные) флаконы добавляют по 1,0 мл воды для ЛАЛ-теста.

Подготовка контрольных флаконов (не прошедших депирогенизацию). Содержание эндотоксина во флаконе после разведения 1 мл воды должно быть около 10 000 ЕЭ/мл. Для ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл такой раствор надо развести примерно в 300 000 раз. Точная регистрация концентрации эндотоксина в данном случае необязательна. Достаточно показать, что его много. С точки зрения целесообразности достаточно провести проверку контрольного раствора в разведении 1/10 000. Такое разведение можно легко приготовить в четыре шага:



В опыт ставится раствор в разведении 1/10 000.

Подготовка флаконов, прошедших депирогенизацию. Поскольку при правильно проведенной термической депирогенизации происходит полное разрушение эндотоксинов, в обработанных флаконах они не будут вообще определяться. Поэтому проверка полученного во флаконе раствора проводится без его дополнительного разведения. В опыт ставится раствор, полученный во флаконе.

Опыт.

Анализ проводится по схеме Качественного анализа (метод А) со всеми контролями:

- Положительный контроль испытуемого образца (испытуемый образец и КСЭ в концентрации 2λ) – Раствор В
- Положительный контроль (КСЭ в концентрации 2λ) – Раствор С
- Отрицательный контроль (вода для ЛАЛ-теста) – Раствор D.

Раствор из флакона, не прошедшего депирогенизацию в разведении 1/10 000	Раствор из флакона, прошедшего депирогенизацию (без разведения).	Контроль положительный (2λ)	Контроль отрицательный
---	--	-----------------------------	------------------------



Раствор (испытываемый образец)	A	Раствор (положительный контроль испытуемого образца)	B	Раствор (испытываемый образец)	A	Раствор (положительный контроль испытуемого образца)	B	Раствор C (положительный контроль)	D	Раствор (отрицательный контроль)
--------------------------------	---	--	---	--------------------------------	---	--	---	------------------------------------	---	----------------------------------

+	+	-	+	+	-
+	+	-	+	+	-

Чувствительность ЛАЛ-реактива 0,03 ЕЭ/мл.

Положительный результат для раствора из флакона, не прошедшего депирогенизацию, в разведении 1/10 000 означает, что содержание эндотоксина в контрольном растворе более 300 ЕЭ/мл или более 300 ЕЭ/флакон.

Отрицательный результат для раствора из флакона (флаконов), прошедшего депирогенизацию, означает, что содержание эндотоксина менее 0,03 ЕЭ/мл или менее 0,03 ЕЭ/флакон.

Оценка результатов

	Концентрация БЭ, ЕЭ/мл	Логарифм концентрации
Необработанный флакон	> 300	2,4771
Обработанный флакон	< 0,03	-1,5229
Снижение концентрации log		4,0000

Снижение концентрации эндотоксина после проведённой процедуры депирогенизации составило **4 Log** (точнее более 4 Log) при достаточном снижении на **3 Log**. Эффективность процедуры депирогенизации подтверждена.

Или

300 ЕЭ/флакон ÷ 0,03 ЕЭ/флакон = 10 000. Концентрация эндотоксина снизилась более чем в 10 000 раз, при требуемом значении - более чем в 1 000 раз. Эффективность процедуры депирогенизации подтверждена.

Заключение

1. Для оценки эффективности термической депирогенизации следует использовать препараты эндотоксина лиофилизированные, без наполнителей и стабилизаторов.

2. Из широкого спектра специализированных препаратов эндотоксина для валидации термической депирогенизации лучше всего подходят индикаторы эндотоксина, предназначенные для прямой валидации.

3. Анализ подготовленных растворов из необработанных и обработанных флаконов можно проводить Качественным гель-тромб тестом (Метод А). Несмотря на то, что точного значения концентрации эндотоксина в растворах из необработанных флаконов получено не будет, можно показать, что концентрация эндотоксина после процедуры депирогенизации снижается как минимум на три порядка.

4. Активность индикаторов эндотоксина всегда указывается как примерная. Этим они отличаются от стандартных КСЭ, для которых в Сертификате анализа указаны и активность, и объемы воды, необходимый для разведения. Фактическая активность полученных растворов во флаконах определяется опытным путем, обязательно в комплекте до/после обработки.

Примечание.

Описанная выше схема может быть использована как общий алгоритм. В каждом конкретном случае ее надо адаптировать под конкретный испытуемый препарат, ЛАЛ-реактив и метод проведения испытаний.

Количество контрольных флаконов и количество флаконов, прошедших депирогенизацию, подбирается в зависимости от задачи.

В примере расчета используется округленное значение чувствительности ЛАЛ-реактива – 0,03 ЕЭ/мл, вместо 0,03125 ЕЭ/мл. Точность в данном случае не очень принципиальна.

Подробности:

ООО «НПО «ЛАЛ-Центр», Москва, Нагатинская ул. Д. 3А.

analiz@limulustest.ru