

ЛАЛ-ТЕСТ

Сборник статей, лекций и практических рекомендаций

ООО «ЛАЛ-ЦЕНТР»

Методические материалы 2002-2008 гг

Подписано к печати: 10.12.2008

Бумага: Офсетная 80 г/м²;

Печать: Ризо.

Условных печатных листов: 14,75.

Тираж: 300 экземпляров.

Отпечатано в типографии: ООО «Новелла».

г. Москва.



ЛАЛ-ЦЕНТР

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Достоинства ЛАЛ-теста как средства контроля качества лекарственных средств.....	4
Пирогены, эндотоксины, пороговая пирогенная доза.....	7
Стандарты эндотоксина.....	10
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА, НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ	
Методы проведения анализа.....	18
I. Природа реакции и общая характеристика методов.....	18
II. Реактивы, их характеристики, сравнение методов.....	24
III. Оборудование, необходимое для проведения инструментальных анализов.....	29
ОФС «Бактериальные эндотоксины» 42-0002-00.....	33
Анализ «бактериальные эндотоксины» в отечественной нормативной документации.....	37
ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ, ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА	
Предельное содержание бактериальных эндотоксинов.....	46
Максимально допустимое разведение.....	50
Гель-тромб тест, чувствительность ЛАЛ-реактива и метода.....	53
Значение pH испытуемого образца и реакционной смеси.....	56
Факторы, мешающие реакции. Проблемные образцы.....	59
ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ, ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА	
Общая схема валидации метода.....	64
Опыт «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», его назначение и место в общей системе контрольных анализов.....	66
Введение раздела «Бактериальные эндотоксины в ФСП. Предварительные анализы.....	72
Проведение анализа «Мешающие факторы».....	75
ПРОВЕДЕНИЕ РУТИННЫХ АНАЛИЗОВ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТА	
Постановка контролей при проведении ЛАЛ-теста.....	82
Наиболее распространенные ошибки опыта и их причины.....	83
ДЕПИРОГЕНИЗАЦИЯ	
Депирирогенизация.....	90
Общие рекомендации по проведению термической депирирогенизации.....	93
РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА	
Реактивы и материалы.....	96
ЛАЛ-реактив Endosafe КТА.....	100
К вопросу о расходных материалах, используемых при проведении анализа.....	101
Использование механических дозаторов при проведении ЛАЛ-теста.....	103
Пластиковые наконечники для автоматических пипеток.....	105
ПРИЛОЖЕНИЯ	
Термины и определения.....	108
Расчеты среднего геометрического	111
Сертификат КСЭ.....	112

Введение

ЛАЛ-тест для определения пирогенности лекарственных препаратов является активно развивающимся в настоящее время способом контроля качества лекарственных средств. Он может быть использован и в некоторых других областях, где необходимо быстрое обнаружение грамотрицательных бактерий или их эндотоксинов. В основе этого теста лежит способность лизата амебоцитов (клеток крови) мечехвоста специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий (липополисахаридами, ЛПС). В результате реакции эндотоксина и лизата происходит помутнение прозрачной реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина.

Реакция лизата амебоцитов с эндотоксином была открыта в США в 1964 году, где и был налажен выпуск первых коммерческих препаратов. Поскольку первые исследования были проведены на мечехвостах вида *Limulus polyphemus*, препарат, полученный из их крови, был назван Лизат амебоцитов *Limulus* (*Limulus* amoebocyte lysate), сокращенно ЛАЛ-реактив и, соответственно, ЛАЛ-тест.

Limulus	Лизат
Amoebocyte	Амебоцитов
Lysate	Limulus

- LAL-Reagent
- LAL-Test
- ЛАЛ-реактив
- ЛАЛ-тест

ЛАЛ-тест считается сегодня наиболее надежным и перспективным способом проверки потенциальной пирогенности лекарственных средств. Преимущества этого теста - высокая чувствительность, простота выполнения, надежность, воспроизводимость, возможность получения количественного результата. К несомненным преимуществам ЛАЛ-теста относится возможность анализировать в короткий срок большое число образцов. При массовом использовании ЛАЛ-тест, безусловно, дешевле теста на кроликах. Кроме того, этот метод дает возможность проводить постадийный контроль содержания эндотоксинов в процессе производства инъекционных препаратов.

Впервые ЛАЛ-тест был включен в Фармакопею США в 1980 году (<85> «*Bacterial Endotoxins Test (BET)*»). Несколько позже он был признан странами Европы и включен в Европейскую фармакопею («*Test for Bacterial Endotoxins*»). Заметным этапом развития метода стала гармонизация требований по проведению анализа, нашедшая свое отражение в новых редакциях Фармакопеи США и Европейской фармакопеи. Новые статьи, действующие с 2000 года, принято называть Гармонизированными статьями, тексты которых практически идентичны в фармакопеях США, Европы и Японии. В 1997 году была принята отечественная версия – ВФС «*Определение содержания бактериальных эндотоксинов. ЛАЛ-тест*». В 2000 году Фармакопейный Государственный Комитет утвердил общую фармакопейную статью «*Бактериальные эндотоксины*» (ОФС 42-0002-00), в которой описывается процедура проведения испытания инъекционных препаратов.

В 2007 году Фармакопейный Комитет утвердил обновленную редакцию этой статьи (ОФС 42-0062-07), которая вошла в XII Фармакопею.

Настоящий сборник включает статьи, опубликованные в разное время в бюллетене «ЛАЛ-тест», а также фрагменты лекций и методических материалов обучающих семинаров, проводимых ЛАЛ-Центром с 2002 года.

Достоинства ЛАЛ-теста, как средства контроля качества лекарственных средств.

Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №2 (3) 2003

ЛАЛ-тест неизбежно сравнивается с проверкой пирогенности на кроликах и, как правило, сравнение это оказывается в пользу ЛАЛ-теста. К очевидным достоинствам метода относят:

- чувствительность метода к бактериальным эндотоксинам, которая превышает чувствительность кроликов;
- возможность количественного выражения содержания бактериальных эндотоксинов;
- возможность быстрого получения результата;
- высокую специфичность по отношению к бактериальным эндотоксинам;
- хорошую воспроизводимость результатов анализа;
- экономическую выгоду, особенно при массовом использовании метода;
- выполнение требований «3Rs» (reduction, refinement, replacement), приводящее к сокращению количества лабораторных животных.

Как это не парадоксально, некоторые очевидные преимущества метода не используются, а некоторые способны вызывать совершенно необоснованное беспокойство. В этой связи интересно подробно рассмотреть практические достоинства ЛАЛ-теста, как метода контроля качества лекарственных препаратов. Возможно, это поможет сделать осознанный выбор в пользу одного из двух методов, не разделяя их на хороший и плохой, а выбирая наиболее подходящий. Пожалуй, основными показателями, влияющими на выбор, являются высокая чувствительность, возможность получения количественного результата, быстрота получения результата и относительная дешевизна метода.

Высокая чувствительность ЛАЛ-теста

Высокая чувствительность ЛАЛ-теста по отношению к бактериальным эндотоксинам является наиболее частым аргументом, который приводят в его пользу. Как правило, указывается, что метод в сотни раз более чувствителен анализа на кроликах. Это не совсем так. В действительности реальная или практическая чувствительность метода зависит от чувствительности ЛАЛ-реактива, используемого в анализе. В случае реактива для геле-тромб теста её стандартные значения составляют диапазон от 0,25 ЕЭ/мл до 0,03 ЕЭ/мл. Кролики способны регистрировать концентрации бактериальных эндотоксинов, примерно равные 0,5 ЕЭ/мл, что соответствует «пороговой пирогенной дозе», равной 5 ЕЭ/кг, следовательно, практическая

чувствительность ЛАЛ-теста превышает чувствительность кроликов всего в 10-15 раз. Такая чувствительность достаточна для гарантированного определения содержания бактериальных эндотоксинов в инфузионных растворах, где предельная концентрация БЭ должна быть наиболее низкой. Для большинства же инъекционных препаратов чувствительность эта даже оказывается избыточной, так как для лекарственных средств, вводимых в малых объемах, могут быть приемлемы концентрации бактериальных эндотоксинов, соответствующие 50 ЕЭ/мл и более.

Необходимо отметить, что потенциальная чувствительность метода действительно очень высока. Инструментальные методы позволяют регистрировать концентрации эндотоксинов до 0,001 ЕЭ/мл. Тем не менее, на сегодняшний день и в США, и в Европе наиболее распространенным является все-таки геле-тромб тест, на долю которого приходится более 50% всех проводимых анализов. Инструментальные же методы оказываются привлекательными не столько из-за своей чувствительности, сколько из-за возможности автоматизации процессов проведения анализа и учета результатов.

К сожалению, высокая чувствительность метода является ощутимым психологическим барьером. Она порождает беспокойство, связанное с возможной выбраковкой продукции. Но с большой долей уверенности можно сказать, что эти страхи присутствуют всегда там, где только начинается переход к ЛАЛ-тесту. И всегда они оказываются беспочвенными. Практический опыт показывает, что производство, у которого не возникает проблем с качеством продукции при проверке на кроликах, без труда воспринимает новый метод.

Возможность количественной оценки содержания бактериальных эндотоксинов

ЛАЛ-тест позволяет определить реальное содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате. Использование геле-тромб теста позволяет выяснить, насколько это содержание меньше установленной величины. Точное определение концентрации эндотоксинов, в том случае, если она больше предельно допустимой величины, представляется делом нецелесообразным. Тем более интересно то, что наиболее распространенным способом фармакопейного анализа является качественный геле-тромб тест, проводимый по принципу «все или ничего». В подавляющем большинстве случаев точное определение содержания БЭ в испытуемом лекарственном препарате просто не нужно.

Возможность количественного определения содержания бактериальных

эндотоксинов оказывается очень полезной при организации постадийного контроля производства. Для установления норм «тревоги» и «действия» необходима количественная оценка концентраций, значительно меньших, чем допустимые для готовых форм.

Быстрота получения результатов

Результаты анализа могут быть получены за 1,5 - 2 часа. Это безусловное достоинство. Однако, контроль качества готовых лекарственных форм предполагает комплексную процедуру, в которой определение содержания бактериальных эндотоксинов не является единственным анализом. В эту процедуру входит и проверка стерильности, которая занимает несколько суток. Поэтому оперативность ЛАЛ-теста не является системообразующим фактором.

Возможность оперативного получения результата приобретает совершенно иное значение в ситуации, когда требуется проверка субстанций, воды для приготовления растворов и других компонентов, используемых на разных стадиях производства. Это позволяет использовать в производстве вспомогательные ингредиенты, не содержащие бактериальные эндотоксины в количествах, которые способны повлиять на качество готовой лекарственной формы.

Дешевизна метода по сравнению с анализом на кроликах

В зарубежной литературе аргумент дешевизны нового метода по сравнению с анализом на кроликах не вызывал споров уже в начале 80-х годов, когда только начинался переход к ЛАЛ-тесту. Сегодня, пожалуй, и у нас споры по этому поводу стихли. И хотя основной реактив достаточно дорог, в условиях крупных производств его стоимость не может считаться серьезным препятствием к введению метода. Не менее важно и то, что метод прост, не требует особых подготовительных работ и специального помещения, а также большого числа сотрудников. Для крупных предприятий, которые уже имеют в своей структуре виварии, вопрос перехода на новый метод может стоять не очень остро. Для нового же производства выбор практически однозначно делается в пользу ЛАЛ-теста. Ведь для вновь организуемого вивария необходимы:

- получение разрешения СЭС, ветеринарных и других служб на строительство вивария;
- подготовка проекта вивария, который должен соответствовать современным требованиям GLP;
- строительство с привлечением необходимых инженерных коммуникаций;

- оснащение вивария необходимым оборудованием;
- обучение и подготовка специалистов для работы с животными в соответствии с правилами GLP;
- приобретение кондиционных животных, кормов, подстилочного материала и т.п.;
- заключение договоров на вывоз и утилизацию биологических отходов и мусора.

Необходимо также учесть, что в обслуживании животных и при проведении испытаний препаратов на пирогенность участвует значительно большее число работников, чем при постановке ЛАЛ-теста. И становится очевидным, что затраты на проведение теста «Пирогенность» не идут ни в какое сравнение с затратами на организацию рабочего места для проведения испытаний с помощью ЛАЛ-теста.

Практически все перечисленные достоинства метода в полной мере проявляются в ситуации контроля качества производства в целом, включая внутрививарийный контроль, статистическую обработку результатов и т.д. Благодаря ЛАЛ-тесту становится возможным контролировать не только конечный продукт, но и ингредиенты, входящие в его состав. И в этом случае, высокая чувствительность метода позволяет выставлять нормы «тревоги» для каждого из компонентов, что дает возможность прогнозировать конечный результат производственного процесса. Безусловным достоинством метода является то, что он легко поддается стандартизации, поэтому можно добиться хорошей воспроизводимости результатов. Статистическая обработка большого количества данных может помочь сделать выводы об общей динамике качества в зависимости от различных, не всегда очевидных причин. В качестве дополнительного плюса можно отметить, что контроль на промежуточных стадиях позволяет не только поднять качество, но и во время обнаружить потенциальный брак и принять меры до того момента, когда исправить уже ничего нельзя. Забракованная серия - это потеря времени, материалов и пр.

Сравнивая два метода анализа - «Пирогенность» и «Бактериальные эндотоксины» можно сказать, что каждый из методов имеет свои недостатки и свои достоинства. Параллельное сравнение методов позволяет сделать очевидный вывод: если производство надежно контролируется с помощью теста, проводимого на кроликах, то переход к ЛАЛ-тесту не сопровождается серьезными проблемами с качеством продукции.

Сегодня оба метода считаются альтернативными, и в отдельных случаях

возможно одновременное включение обоих методов в ФСП. Смысл такого состояния дел заключается в возможности испытания лекарственного средства на пирогенность в том случае, если проведение ЛАЛ-теста невозможно. Например, при проведении независимого контроля готовой серии в контрольно-аналитической лаборатории, не располагающей базой для проведения ЛАЛ-теста. В такой ситуации можно провести анализ «Пирогенность». Надо иметь ввиду, что это единственная трактовка понятия «альтернативные анализы» в том виде, в котором оно существует сегодня. Другие варианты, например, пере проверка одного метода другим в случае получения неудовлетворительных результатов по одному из них, являются неприемлемыми. При обнаружении превышения содержания БЭ в препарате, даже если испытание на пирогенность удовлетворяет требованиям ФСП, препарат бракуют. Фармацевтическое предприятие, включившее оба метода в ФСП, отвечает за удовлетворительные результаты по каждому из них. Очевидно, что надолго сохранять такую взаимозаменяемость методов не имеет никакого смысла. Эти промежуточные решения при всей их внешней привлекательности так и остаются промежуточными.

Параллельное сосуществование обоих методов в условиях одного производства

нецелесообразно. Так, введение ЛАЛ-теста для внутривыпускного контроля делает нецелесообразным для готового продукта контроль по показателю «Пирогенность». В том же случае, если в качестве главного метода все-таки остается проверка пирогенности, то высокие характеристики ЛАЛ-теста оказываются неустраиваемыми.

Введение новых правил посерийной сертификации лекарственных средств и повышение требований к оснащённости сертифицированных контрольно-аналитических лабораторий будут объективно способствовать включению этого метода в практику их работы. Это должно привести к тому, что понятие «альтернативные методы» станет буквальным: производитель лекарственного средства будет выбирать для ФСП метод, более подходящий для данного препарата и производства. На этом альтернативность решения собственно и исчерпывается. Далее лекарственное средство будет проверяться одним, предписанным в ФСП методом. Это соответствует принципу, принятому во всем мире: «Все инъекционные лекарственные препараты необходимо контролировать с помощью ЛАЛ-теста, и только те из них, для которых этот контроль невозможен, в экспериментах на кроликах».

Пирогены, эндотоксины, пороговая пирогенная доза

Материалы Семинара «Проведение контрольных анализов в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины»

Термин «пироген» происходит от греческого "pyreto" – лихорадка. Пирогенами называют вещества, способные вызывать повышение температуры тела. Температурная реакция организма связана с синтезом белков (цитокинов), которые участвуют в механизме повышения температуры, оказывая воздействие на систему терморегуляции. Эти вещества называют *эндогенными пирогенами*, т.е. пирогенами, образованными «внутри» организма. Соответственно вещества, попадание которых в организм высших животных приводит к повышению температуры, называют *экзогенными пирогенами*. Пирогенную реакцию - повышение температуры тела - способны вызывать вещества самой различной природы и разного происхождения. К экзогенным пирогенам можно отнести: грамотрицательные бактерии и их токсины, грамположительные бактерии и их токсины, вирусы и продукты их жизнедеятельности, а так же стероиды, синтетические адъюванты и пр. Несмотря на то, что список пирогенов довольно обширен, в области контроля качества инъекционных лекарственных средств практическое значение имеют главным образом пирогены, вырабатываемые грамотрицательными бактериями – *бактериальные эндотоксины*. Интересен и сам термин "эндотоксины", который предполагает, что эти токсины находятся внутри бактерии в отличие от "экзотоксинов" - токсинов, выделяемых бактериями в процессе жизнедеятельности в окружающую среду. В действительности эндотоксины являются частью наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а во внешней среде они оказываются после разрушения клетки, в сущности, представляя собой осколки клеточной стенки. Термины «пирогены» и «эндотоксины» употребляются как синонимы и, хотя не все пирогены являются эндотоксинами, наиболее значимыми являются именно эндотоксины грамотрицательных бактерий. Этому есть несколько объяснений:

1. Бактерии вездесущи по своей природе, они могут присутствовать в субстанциях, используемых для приготовления лекарственных форм, в системах получения и распределения воды, на поверхности технологического оборудования, в воздухе производственных помещений, на одежде и руках персонала.

2. Эндотоксины грамотрицательных бактерий остаются биологически активными молекулами и после гибели бактерий. Молекула эндотоксина термостабильна и легко выдерживает цикл стерилизации в автоклаве. Малые размеры молекул эндотоксинов позволяют им легко проходить через мембраны, используемые для стерилизации растворов (0,22мкм). Поэтому эндотоксины могут присутствовать в готовых лекарственных формах, даже произведенных в асептических условиях и прошедших финишную стерилизацию.

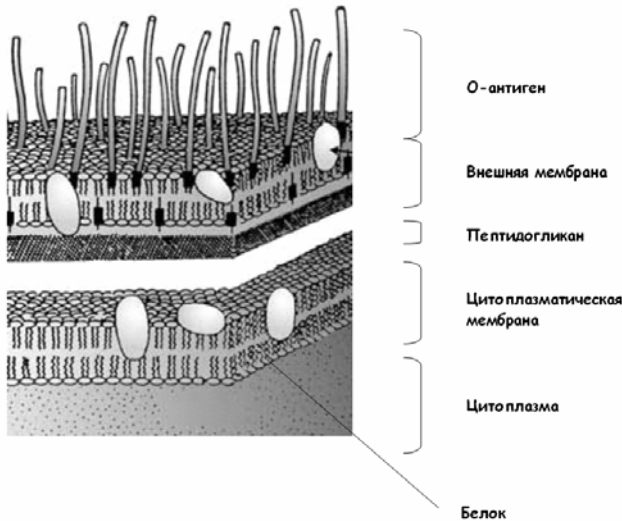
3. Бактериальные эндотоксины являются исключительно активными (сильными) пирогенами. Для развития лихорадочного приступа достаточно присутствия бактериальных эндотоксинов в инфузионном растворе в концентрации 1 нг/мл (около 10 ЕЭ/мл). Другие пирогены менее активны, и для развития пирогенного ответа их концентрация должна быть в 100-1000 раз больше.

Именно поэтому нельзя исключить возможности присутствия бактериальных эндотоксинов в готовых лекарственных препаратах. Даже в небольших концентрациях эндотоксины могут быть опасны для человека. Поэтому каждая серия инъекционных лекарственных препаратов должна проверяться на предмет содержания этих нежелательных примесей. Для этой цели используются два альтернативных метода: анализ «Пирогенность» и анализ «Бактериальные эндотоксины». Если в испытуемом растворе эндотоксины присутствуют в высоких концентрациях, это приводит к повышению температуры кроликов – пирогенной реакции, которая регистрируется в тесте «Пирогенность». Анализ «Бактериальные эндотоксины» позволяет определить концентрацию эндотоксинов и сравнить ее с пороговым значением, установленным для данного препарата. Таким образом, несмотря на большую разницу, оба эти метода, по сути, измеряют одно и то же – содержание бактериальных эндотоксинов в растворе лекарственного препарата, обеспечивая его безопасность для человека.

ЭНДОТОКСИНЫ

Бактерии можно разделить на два класса в зависимости от их способности окрашиваться по методу, разработанному голландским бактериологом Гансом Христианом Граммом в 1887 году. В процессе отмывки, которая следует за процедурой окрашивания, грамположительные бактерии удерживают фиолетовый краситель, а грамотрицательные теряют его, окрашиваясь в красный цвет.

Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий (Good C.M., Lane H.E. 1977)



Позже было показано, что это явление обусловлено фундаментальными различиями в структуре клеточных стенок двух указанных классов бактерий. Материал клеточных стенок, который присутствует у обоих видов бактерий, известен как пептидогликан. Его называют также гликопептидом или мукопептидом. Это сложный матрикс, содержащий полисахаридные цепи, связанные друг с другом поперечными сшивками из коротких пептидных цепей. У грамположительных бактерий (например, *Bacillus subtilis*) эти цепи образуют трехмерный волокнистый матрикс, имеющий до 40 слоев, в то время как у грамотрицательных (например, *E.coli*) слой только один. Таким образом, толщина пептидогликанового матрикса у разных бактерий может составлять от 1 до 80 нм. Грамположительные бактерии

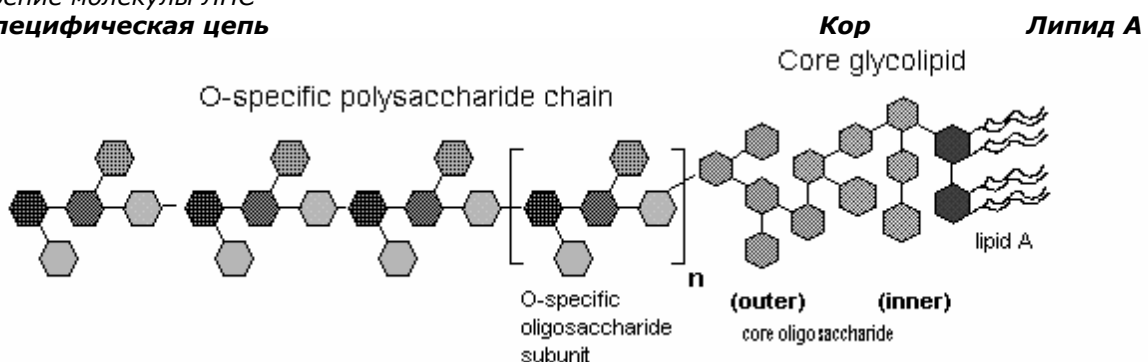
обладают однослойной нелипидной клеточной стенкой толщиной 20-80 нм, окружающей цитоплазматическую мембрану.

У грамотрицательных же бактерий клеточная стенка, окружающая цитоплазматическую мембрану, двухслойная. Первый слой - очень тонкая (толщиной 1 нм) нелипидная мембрана окружена вторым слоем - липидной мембраной толщиной 7,5 нм.

Именно на этой внешней мембране и расположены эндотоксины (липополисахариды). Молекулы эндотоксина обеспечивают структурную целостность, отвечают за многие физиологические функции, в том числе определяют патогенные и антигенные свойства бактерий.

Структурно молекула эндотоксина делится на три части - *Липид А*, *Кор* и *О-специфическую цепь*.

Строение молекулы ЛПС
О-специфическая цепь



Липид А состоит из дисахарида, фосфата и жирных кислот. Жирные кислоты, входящие в состав Липида А, могут быть насыщенными и ненасыщенными, наиболее часто в состав Липида А входят кислоты: пальмитиновая, лауриновая, глутаминовая, меристиновая. Участок Липида А является наиболее константным участком молекулы ЛПС, и его строение схоже у многих бактерий.

О-специфическая цепь липополисахаридов построена из повторяющихся олигосахаридов. Наиболее распространенными сахарами, входящими в состав О-специфической цепи, являются глюкоза, галактоза, рамноза. Этот участок молекулы придает ей гидрофильные свойства, благодаря которым ЛПС хорошо растворимы в воде. Полисахаридная часть является наиболее вариабельной частью молекулы ЛПС. Часто этот фрагмент молекулы называют О-антигеном, так как именно он отвечает за антигенную активность грамотрицательных бактерий.

Кор - центральная часть молекулы, связывающая О-антиген с Липидом А. Формально структура кора подразделяется на внешнюю и внутреннюю части. В состав внутренней части кора

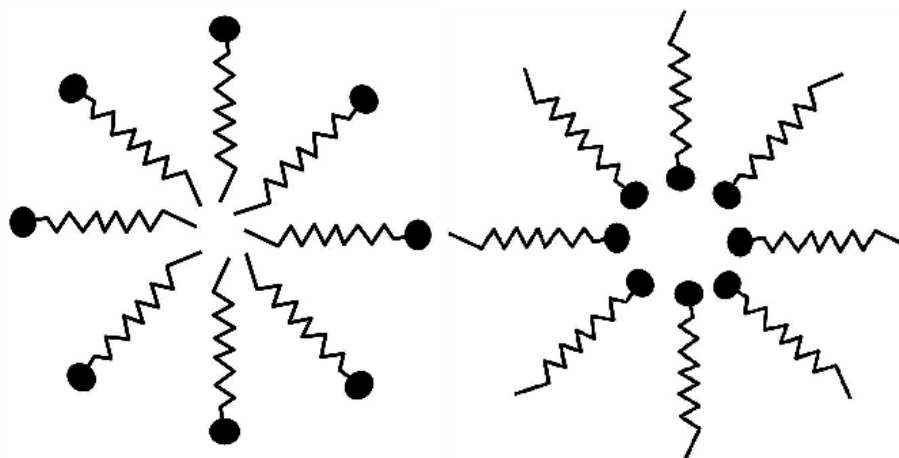
обычно входят остатки L-глицеро-О-манногептозы и 2-кето-3-дезоксооктоновой кислоты (КДО). КДО содержит 8 атомов углерода и в природе практически нигде больше не встречается.

Молекула ЛПС сочетает сразу множество разных свойств. Жирные кислоты придают молекуле ЛПС гидрофобные свойства. Участок, представленный полисахаридом, придает молекуле гидрофильные свойства.

Такие молекулы, обладающие двойственными свойствами, называются амфипатическими.

Специфическая особенность этих соединений – способность одновременно вступать как в гидрофильные, так и в гидрофобные взаимодействия. В воде амфипатические липиды образуют

Нормальные и «вывернутые» мицеллы



мицеллы, в которых гидрофобные жирнокислотные хвосты находятся внутри сферической капли, а полярные головки расположены на ее поверхности и контактируют с полярным растворителем-водой. Если молекулы ЛПС находятся в растворе с высоким содержанием липида (масляные растворы), наблюдается обратная картина: полярные головки образуют центральную область сферы, включающую в себя и воду, а жирнокислотные цепи располагаются снаружи. Такие мицеллы называют «вывернутыми».

На поведение молекул в растворе оказывает влияние и заряд липидной части. Так, если в растворе присутствуют двухвалентные катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , вокруг них собираются молекулы ЛПС, имеющие отрицательно заряженную полярную головку. В результате образуются крупные агрегаты диаметром более 0,1 мкм. В зависимости от свойств раствора молекулы ЛПС могут иметь молекулярную массу от 10000-20000 до 100000 Дальтон.

На внешней стенке одной грамотрицательной бактерии может содержаться до 3,5 млн. молекул ЛПС. После ее гибели все они оказываются в растворе. Если учитывать то, что эндотоксины очень стабильны и трудно разрушаются, становится понятным, почему молекулы ЛПС считаются наиболее распространенным высокомолекулярным органическим комплексом, встречающимся в природе.

Следует обратить внимание на то, что кроме липополисахаридов в состав внешней стенки грамотрицательных бактерии входят и белки (внешняя мембрана на $\frac{3}{4}$ состоит из ЛПС и только $\frac{1}{4}$ приходится на белковые компоненты). Эти белки вместе с ЛПС образуют белково-липидополисахаридные комплексы разного размера и молекулярной массы. Именно эти комплексы и называются бактериальными эндотоксинами. Очищенные препараты, которые используются в качестве стандартов, лишены пептидных фрагментов и представляют собой чистый препарат липополисахарида. Тем не менее, термин «бактериальные эндотоксины» применяется с равным успехом и к естественным эндотоксинам, оказавшимся в растворе в результате разрушения бактерий, и к чистым препаратам ЛПС. Надо отметить, что природные эндотоксины менее активны (менее пирогенны), чем очищенные препараты ЛПС, используемые в качестве стандартов эндотоксина.

Пороговая пирогенная доза

Эндотоксины способны вызвать широкий спектр биологических реакций, причем не все эти реакции являются патогенными. Небольшие концентрации ЛПС оказывают иммуномодулирующее действие, поддерживая иммунную систему в тонусе. И все же в большинстве случаев попадание эндотоксинов в кровь запускает разнообразные взаимосвязанные процессы, которые могут иметь очень серьезные последствия. Физиологическую реакцию организма могут вызвать как эндотоксины, связанные с жизнеспособными грамотрицательными бактериями, так и свободные «осколки» клеточной стенки. Большая часть этих реакций определяется липидной частью молекулы эндотоксина, а именно Липидом А.

Реакции, вызываемые эндотоксинами (ЛПС):

- Пирогенность;
- Синтез цитокинов – интерлейкинов и факторов некроза опухоли;
- Активация системы комплемента;
- Лейкопения;
- Агрегация тромбоцитов;
- Снижение артериального давления;

- *Обширное внутрисосудистое свертывание крови;*
- *Необратимый шок и смерть.*

Возможность количественного определения концентрации эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста стимулировала исследования зависимости физиологических реакции организма от концентрации эндотоксинов в крови. Основное внимание было уделено определению той концентрации или дозы эндотоксинов, которая приводит к развитию пирогенной реакции. Использование ЛАЛ-теста для контроля качества лекарств было невозможно без выражения пирогенной дозы в единицах измерения нового метода, т.е. в Единицах Эндотоксина (ЕЭ).

Исследования проводились на большом количестве животных и в заключительной стадии на добровольцах. Была определена средняя пирогенная доза (APD, Average Pyrogenic Dose), при которой суммарное повышение температуры у восьми кроликов превышало 3,7°C. Эта доза составляет 1,04 – 1,79 нг/кг эндотоксина *E.coli* (среднее значение 1,37 нг/кг). Нижняя граница этого диапазона – 1,0 нг/кг была определена как Пороговая Пирогенная Доза (TPD, Threshold Pyrogenic Dose), которая и была принята в качестве стандарта для фармацевтической промышленности.

Эти фундаментальные исследования проводились еще до введения понятия Единицы Эндотоксина, которое появилось несколько позже. Выраженная в Единицах Эндотоксина эта пороговая пирогенная доза составляет 5 ЕЭ/кг. Значение пороговой пирогенной дозы используется для расчета допустимого содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах при введении показателя «Бактериальные эндотоксины» в НД или ФСП на препарат.

Следует отметить, что пороговая пирогенная доза у кроликов и у человека примерно одинаковы, вместе с тем, реакция на большие дозы эндотоксина у человека гораздо более бурная и сильная, чем у кроликов. Именно поэтому реакция человека на дозы эндотоксина, значительно превышающие пороговую, никогда не исследовалась. Впрочем, это обстоятельство не изменяет базового отношения к анализу «Пирогенность» и к связанному с ним понятию «Пороговой пирогенной дозы» как к надежному предсказателю пирогенного риска для человека.

Стандарты эндотоксина

А.Г.Ситников, Н.П.Неугодова, Г.В.Долгова,

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №4 (5) 2003

При работе с ЛАЛ-реактивом используются два типа стандартов эндотоксина: Международный стандарт эндотоксина (МС) и Контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ). Если названию (определению) Международный стандарт соответствует один единственный препарат, то в качестве контрольных стандартов используется большая группа препаратов эндотоксина. Общее назначение стандартов эндотоксина – это валидация метода и получение стандартизованных и воспроизводимых результатов. В рамках этих задач на долю Международного стандарта приходится калибровка ЛАЛ-реактива и контрольных стандартов эндотоксина, его также используют при проведении арбитражных анализов. Назначение контрольных стандартов эндотоксина сводится к валидации рутинных анализов, проводимых с помощью ЛАЛ-теста, а также к валидации процессов депирогенизации. То обстоятельство, что контрольные стандарты эндотоксина являются вторичными по отношению к основному стандарту, в известной степени, ограничивает возможности их использования и находит свое отражение в специфических правилах интерпретации анализа.

Настоящая статья посвящена этим двум стандартам и, отчасти, истории становления Международного стандарта.

Международный стандарт эндотоксина и Национальный стандарт эндотоксина США

Бактериальные эндотоксины проявляют широкий спектр биологической активности, в данном случае наибольший интерес представляет способность эндотоксинов вызывать гелирование ЛАЛ-реактива и пирогенную реакцию у млекопитающих. Активность препаратов эндотоксина зависит не только от его природы (микроорганизма-продуцента), но и от степени и способа его очистки, а также от свойств раствора, в котором он находится. Например, один из первых стандартов, претендовавших на роль международного стандарта, при сравнении его активности посредством двух разных коммерческих ЛАЛ-реактивов демонстрировал активность, равную 3,32 ЕЭ/нг в тесте с ЛАЛ-реактивом «Pyrogen» и 1,05 ЕЭ/нг в тесте с ЛАЛ-реактивом «Pyrotell». В данном случае наблюдается разная способность одного и того же препарата эндотоксина вызывать гелирование различных коммерческих ЛАЛ-реактивов (1). Еще большей вариабельность результатов может быть для препаратов эндотоксина, полученных из разных микроорганизмов. Очевидно, что для полноценного использования ЛАЛ-теста необходимо было создать условия, позволяющие стандартизовать результаты

анализов, проводимых в разных лабораториях и с разными ЛАЛ-реактивами. Для этого нужно было ввести единый стандарт эндотоксина. Несмотря на очевидность и сравнительную ясность постановки проблемы, решение ее оказалось далеко не простым делом и затянулось почти на двадцать лет. Первые работы по производству такого стандарта были начаты в США еще в 70-х годах. В конечном счете они привели к созданию Национального стандарта фармакопеи США, которому затем был присвоен международный статус.

Первым стандартом эндотоксина для ЛАЛ-теста стал стандарт, приготовленный в 1972 году из *Klebsiella pneumoniae*. В то время это был, пожалуй, наиболее хорошо изученный препарат эндотоксина. Препарат был высушен с 0,1% раствором человеческого сывороточного альбумина. Он получил название - Lot 1b. Партия была очень маленькой, и к тому же результаты исследования пирогенности этого стандарта на кроликах сильно варьировали. Эти обстоятельства заставили отказаться от него и заменить его новым препаратом. Для производства второго стандарта был выбран штамм *Escherichia coli* 0113:H10:KO(-), серии стандарта стали индексировать буквами ЕС с цифрой, указывающей на порядковый номер серии. Первая серия - ЕС-1 была приготовлена в 1976 году. Это была маленькая пилотная партия из 200 флаконов. Активность стандарта оказалась неудовлетворительной, и практического значения он не имел (2). Положительным моментом оказалось то, что была отработана технология производства и оценки активности готового препарата. Одновременно конкретизировались и представления о том, каким должен быть идеальный препарат эндотоксина. Среди наиболее желательных характеристик были:

- хорошая стабильность препарата при хранении;
- бактерия-продуцент должна быть достаточно распространенной причиной пирогенности лекарственных средств;
- пирогенность стандарта должна быть проверена на человеке и кроликах;
- партия должна быть представлена достаточным количеством образцов.

Следующая серия - ЕС-2 состояла примерно из 1200 флаконов. Этот стандарт соответствовал большинству требований, предъявляемых FDA к стандарту эндотоксина, и был принят в качестве Национального стандарта Эндотоксина США - RSE (US Reference Standard Endotoxin) (3). Интересно, что предметом критики первого стандарта было то, что *Klebsiella pneumoniae* не является частой причиной загрязнения фармацевтических препаратов. Но и

Escherichia coli, в этом смысле, является не на много более удачным выбором. Более вероятной причиной загрязнений фармацевтических препаратов являются микроорганизмы - загрязнители систем очистки воды (*Pseudomonas* и др.). Возможно, на выбор бактерии-продуцента эндотоксина повлияло то, что в то время ЛАЛ-тест предполагалось использовать и для диагностики заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями. По-видимому, это объясняет причину, по которой в качестве стандарта эндотоксина решено было использовать сначала *Klebsiella pneumoniae*, а затем *E.coli*. (4).

Стандарт ЕС-2 просуществовал до 1 июля 1980 года. Большая часть серии была потрачена на эксперименты по установлению значения пороговой пирогенной дозы. Предполагалось, что следующая партия, приготовленная по той же технологии и из той же субстанции, будет адекватной заменой серии ЕС-2. Однако, следующая серия оказалась неудачной. Неудачной была и серия ЕС-4, активность которой была примерно в четыре раза ниже активности ЕС-2. И только характеристики серии ЕС-5, приготовленной в 1981 году, оказались удачными. В этом же году совместными усилиями FDA и трех производителей ЛАЛ-реактива было введено значение единицы эндотоксина (*Endotoxin Unit, EU*), равное 0,2 нг эндотоксина ЕС-2. Переход на единицы эндотоксина упростил процедуру принятия нового стандарта ЕС-5, активность которого можно было выражать уже не в весовых, а в относительных единицах. Активность ЕС-5 была установлена в исследовании, в котором участвовали 14 лабораторий. Новый стандарт оказался примерно в 2,1 раза активнее ЕС-2 (этот факт лишний раз подчеркивает сложности, с которыми приходится сталкиваться при стандартизации препаратов эндотоксина, ведь все партии от ЕС-1 до ЕС-6 готовили из одного и того же сырого препарата ЛПС и по одной технологии очистки и сушки). После пересчета активности нового стандарта было решено считать, что содержание эндотоксина в одном флаконе составляет 10000 ЕЭ. Именно это значение и стали указывать на его этикетке (5,6,7).

В середине 80-х годов ЛАЛ-тест получил международное признание, и началось его включение в национальные фармакопеи. Одновременно началась и история Международного стандарта эндотоксина. Метод проведения анализа, включаемый в Фармакопеи, был в основном аналогичен методу, описанному в Американской фармакопее (в начале 80-х годов основной фармакопейным методом был гель-тромб тест). Во многом это объяснялось тем, что ЛАЛ-реактив, предназначенный для проведения фармакопейных анализов, производился (и производится в настоящее

время) в США. В отношении же контрольных стандартов эндотоксина казалось, что свобода выбора гораздо шире. Естественно появилось множество национальных стандартов эндотоксина, но, как отмечалось выше, разные препараты эндотоксина могут проявлять разную активность. Поэтому, одновременное существование нескольких стандартов приводило к необходимости перекалибровывать ЛАЛ-реактив по разным препаратам эндотоксина. Совершенную сумятицу могла вызвать и вариабельность реакции разных стандартов и разных ЛАЛ-реактивов, и невозможность установления истины в спорных случаях (арбитраж). Очевидно, что такое положение дел не могло долго оставаться неизменным. Необходимость унификации результатов анализа привела к созданию Международного стандарта эндотоксина.

Первый Международный стандарт (МС) эндотоксина (International standard, IS) был разработан Экспертным комитетом по Биологическим Стандартам (ECBS) ВОЗ в 1987 году. Согласно традиции поддержания преемственности с наиболее широко используемыми национальными стандартами этот стандарт калибровался в единицах, принятых для национального стандарта США EC-5 (RSE). Исключением стало обозначение единицы эндотоксина: International Unit (IU) вместо принятого в США обозначения - Endotoxin Unit (EU). Чтобы добиться наиболее возможной унификации со стандартами серии ЕС, Международный стандарт был приготовлен из того же сырья (субстанции) и по той же технологии, что и ЕС-5. Несмотря на это, активность его оказалась выше и составила 14000 IU/флакон (10000 EU/флакон для RSE). Проверка и калибровка этого стандарта проводились с помощью разных коммерческих препаратов ЛАЛ-реактива и, в основном, с помощью геля-тромб теста, так как этот метод в то время был наиболее распространенным способом проверки содержания бактериальных эндотоксинов. Первый международный стандарт был принят как стандарт для анализов, проводимых этим методом. Этот Международный стандарт одно время так и называли *gelated standard*, т.е. стандарт, предназначенный для анализа, в котором конечной точкой являлось гелирование ЛАЛ-реактива. Результаты должны были выражаться в единицах Международного стандарта, при этом формула 1IU=1EU считалась верной только для результатов, полученных с помощью геля-тромб теста. В качестве стандарта для инструментальных – турбидиметрического и хромогенного методов - он не использовался (8).

Даже после появления Международного стандарта Национальный стандарт эндотоксина США (RSE) оставался основным стандартом эндотоксина, поскольку по нему

калибровались коммерческие ЛАЛ-реактивы, предназначенные для разных анализов. Все более широкое применение фотометрических методов проведения ЛАЛ-теста стимулировало разработку нового международного стандарта, который можно было бы использоваться для всех типов анализов. Такой стандарт появился благодаря совместным усилиям ВОЗ и FDA.

Задача производства большой партии этого препарата была поставлена перед Национальным Институтом Биологических Стандартов и Контроля в Великобритании (NIBSC), входящим в состав ВОЗ. Этот стандарт был приготовлен в 1994 году. Он представлял собой экстракт клеток *E.coli 0113:H10* и был приготовлен из той же субстанции, которая использовалась для производства всех стандартов серии ЕС, начиная с 1976 года. Активность нового стандарта оказалась такой же, как и у старого препарата ЕС-5, т.е. была равна 10000 EU/флакон. В исследовании его свойств участвовали 26 лабораторий из 12 стран (9). Новый стандарт эндотоксина был принят Американской Фармакопеей в 1995 году и получил название lot G. Он же был принят FDA под названием ЕС-6. В октябре 1996 года ВОЗ приняла этот стандарт в качестве Международного Стандарта (Второй Международный стандарт, IS-2). В июне 1997 года этот стандарт был принят Европейской Фармакопеей под названием BPR-3 (*Biological Reference Preparation for endotoxin*). В литературе этот общий стандарт часто называют «гармонизированным стандартом». Действительно впервые был получен единый стандарт эндотоксина при том, что названия национальных стандартов эндотоксина сохранили свою преемственность, изменив только индекс: IS-2 вместо IS или ЕС-6 вместо ЕС-5 (табл. 1).

Табл.1 Организации, принявшие Международный стандарт эндотоксина.

Организация	Год	Название	Микроорганизм	Ед. акт
ВОЗ	1996	IS-2	<i>E. coli 0113:H10</i>	IU
FDA	1995	EC-6	<i>E. coli 0113:H10</i>	EU
USP	1995	Lot G	<i>E. coli 0113:H10</i>	EU
Eur. Pharm	1977	BRP-3	<i>E. coli 0113:H10</i>	IU

Принятие МС оказалось очень важным шагом еще и потому, что открыло возможность гармонизации процедур проведения анализа, что нашло свое отражение через три года в принятии гармонизированной версии

фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины». Новая редакция статьи была одновременно принята фармакопеями США, Японии и Европейской фармакопеей. В новой статье указано, что все результаты выражаются в единицах международного стандарта (неважно, как они обозначаются EU или IU). Тогда же в 2000 году была принята и новая отечественная статья «Бактериальные эндотоксины» (ОФС 42-0002-00). В ней так же в качестве стандарта эндотоксина был принят Международный стандарт.

Приготовленная партия Международного стандарта состояла примерно из 60 тысяч флаконов. Это была самая большая серия за всю историю производства стандартов эндотоксина. Но и такого большого количества недостаточно для удовлетворения потребностей всех работающих с ЛАЛ-реактивом. Поэтому, учитывая ограниченность партии этого стандарта, его назначение сводится к стандартизации ЛАЛ-реактива, КСЭ и, при необходимости, он используется при решении спорных вопросов для проведения арбитражных анализов.

Образно говоря, МС является хранителем понятия Единицы эндотоксина и связанного с ней понятия «Пороговой пирогенной дозы». В опытах с ЕС-2 было установлено значение пороговой дозы эндотоксина, которая способна вызвать пирогенный ответ у человека. Одновременно была установлена корреляция между способностью стандарта эндотоксина вызывать пирогенную реакцию у человека и активностью этого стандарта в ЛАЛ-тесте. В результате была получена известная всем формулировка: человеку может быть введено не более 5ЕЭ/кг/час. Сегодня это значение используется в качестве отправной точки при расчете предельного содержания бактериальных эндотоксинов в инъекционных лекарственных препаратах. Достоверность, а значит и безопасность этой формулы обеспечивается существованием одного единственного препарата эндотоксина – МС, каждая следующая серия которого принимает эстафету от предыдущей.

С Международным стандартом практически не сталкиваются конечные пользователи, так как при проведении анализа они работают с контрольными стандартами эндотоксина.

Контрольные стандарты эндотоксина.

Для проведения контроля в ходе повседневных анализов используются препараты эндотоксина, которые называются Контрольными стандартами эндотоксина (КСЭ) или *Control Standard Endotoxin (CSE)*. Эти стандарты калибруются по МС и, соответственно, оказываются вторичными по отношению к Международному стандарту. Предназначение КСЭ – служить именно инструментом контроля (валидации) реакции

ЛАЛ-реактива при проведении рутинных анализов. Стандартизация активности КСЭ проводится по ЛАЛ-реактиву, т.е. опосредованно. Сначала определяется чувствительность новой серии ЛАЛ-реактива по Международному стандарту, чувствительность эта выражается в ЕЭ/мл. Затем этот реактив с уже известной чувствительностью используется для оценки активности серии КСЭ. Для этого готовится серия разведений КСЭ, концентрации которого выражаются в нг/мл. В опыте определяется минимальная концентрация КСЭ, которая способна вызвать гелирование ЛАЛ-реактива, с известной чувствительностью (выраженной в ЕЭ/мл). После этого рассчитывается активность эндотоксина в реакции с проверяемой серией ЛАЛ-реактива. Результат сравнения выражается в ЕЭ/нг. Важно помнить, что с другой серией ЛАЛ-реактива эта активность может быть иной. Именно поэтому на флаконе с КСЭ указывается содержание ЛПС в нг или мкг, а не указывается его активность в единицах эндотоксина во флаконе. Поэтому так важно иметь сертификат активности КСЭ, связанный с конкретной серией ЛАЛ-реактива. Такая система оценки активности КСЭ может показаться слишком сложной, но она существует уже очень давно и не вызывает особых проблем для конечного пользователя. Следует обратить внимание на одну очень интересную деталь – при проведении рутинных анализов КСЭ служит контролем активности той системы, которая использовалась для его калибровки. Этот факт приходится учитывать при проведении анализов. Поэтому, например, анализ по подтверждению заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива является именно подтверждением, а не определением чувствительности реактива. Если по результатам теста чувствительность ЛАЛ-реактива сильно отличается от заявленной, то полученное значение является недействительным, даже если реактив оказался «более чувствительным» чем указано на этикетке.

Контрольным стандартом может быть практически любой препарат эндотоксина при условии, что он отвечает определенному набору требований. В Фармакопее США 20-23 изданий и в руководстве FDA по валидации метода были приведены требования, которым должен удовлетворять КСЭ, и приводилось описание способа его калибровки. В частности указывалось, что КСЭ должен иметь активность не менее 2 ЕЭ/нг и не более 50 ЕЭ/нг. Главное условие, разрешающее использование КСЭ: его активность должна быть определена по национальному стандарту с помощью того ЛАЛ-реактива, с которым он будет использоваться, и тем методом, который предписан для данного реактива (10, 11).

Интересно, что в новой Гармонизированной статье «Бактериальные эндотоксины» упоминание о КСЭ и о способах его калибровки уже отсутствуют. Международный стандарт – единственный препарат эндотоксина, упоминаемый в этой статье (12). Поначалу это вызвало большую растерянность, так как отсутствие упоминания о Контрольных стандартах в фармакопейной статье, могло означать необходимость использования только Международного стандарта при проведении рутинных анализов. Это привело бы к значительному увеличению стоимости рутинных анализов. В действительности же исключение упоминания о КСЭ в фармакопейной статье явилось следствием того, что многолетний опыт использования различных контрольных препаратов эндотоксина показал их надежность и стабильность. Поэтому было решено, что в специальном нормировании их свойств более нет никакой необходимости. Все это никак не повлияло на существующую уже более двадцати лет систему использования контрольных стандартов эндотоксина, поставляемых с ЛАЛ-реактивом. (13, 14).

Процедура калибровки КСЭ проводится всеми производителями перед выпуском в продажу конкретной серии ЛАЛ-реактива и связанной с ней конкретной серией КСЭ. В этом контексте очевидно, что принципиальное значение для достоверности анализа при определении бактериальных эндотоксинов имеет использование пары конкретных препаратов ЛАЛ-реактива и КСЭ. Возможно, категоричность этого требования может быть несколько преувеличена, однако, опасность получения недостоверных результатов при вольном использовании разных партий ЛАЛ-реактивов и КСЭ очень велика. И особенно велика она будет при использовании КСЭ и ЛАЛ-реактивов от разных производителей.

Возможность использования пары ЛАЛ-КСЭ подтверждается сертификатом соответствия. Разные компании оформляют его по-разному, но содержательная часть у всех одинакова.

Стоит отметить, что в действительности в качестве КСЭ, как правило, используются препараты *E.coli* двух штаммов: *O113:H10* и *O55:B5*. Очищенный липополисахарид штамма *O55:B5* тоже очень известный стандарт, который традиционно используется в качестве стандарта при проверке изделий медицинского назначения. Так же в качестве контрольного стандарта использовался препарат под названием «Novopyrexal» (NP), полученный из *Salmonella abortus equi*. Раньше серия NP-2 этого стандарта использовалась в качестве официального стандарта Европейской фармакопеи (4).

Как уже упоминалось выше, основные функции КСЭ сводятся к валидации рутинных

анализов. При проведении анализа необходимо контролировать способность ЛАЛ-реактива реагировать с эндотоксинами, которые могут содержаться в растворе лекарственного препарата для этого в качестве модели используется препарат КСЭ, который позволяет:

1) Убедиться в том, что реактив не потерял своей чувствительности при хранении и транспортировке и после разведения;

2) Убедиться в том, что при проведении анализа соблюдаются все необходимые условия проведения реакции;

3) Убедиться в том, что эндотоксин в испытуемом растворе способен реагировать с ЛАЛ-реактивом также как и в водном растворе.

Перечисленные задачи решаются с помощью анализов «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» и «Мешающие факторы», а так же с помощью системы контролей, которые ставятся с каждым рутинным анализом. В данном случае речь идет о положительном контроле и положительном контроле испытуемого образца.

Но функции КСЭ не исчерпываются перечисленными задачами. Стандарт эндотоксина может использоваться и для валидации процедур депирогенизации, и для валидации технологического оборудования. Очень важно помнить, что для этих целей выпускаются специальные препараты КСЭ, хотя могут использоваться и стандарты, предназначенные для фармакопейных анализов. Причина такого разнообразия в назначении КСЭ заключается в том, что ЛАЛ-тест широко применяется для оценки чистоты изделий медицинского назначения, причем описание процедуры приведено даже в статье «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США. В контексте этой статьи «испытуемым образцом» может быть лекарственное средство или сыв (экстракт) с изделия медицинского назначения. Следует отметить, что в ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины», так же как и аналогичная статья Европейской фармакопеи не нормирует качество изделий медицинского назначения и, соответственно, упоминание о правилах проведения такого анализа отсутствует в текстах упомянутых статей.

При оценке эффективности процедуры депирогенизации или технологии получения изделия медицинского назначения стандарт эндотоксина используется как модель загрязнения. Оценка содержания эндотоксина до и после обработки позволяет оценить эффективность оборудования, используемого для депирогенизации. Для решения этих задач могут использоваться препараты КСЭ, содержащие ЛПС в десятки или сотни раз больше, чем стандартные препараты,

используемые при проведении фармакопейного анализа. В каталогах компаний-производителей они часто называются «Стандартами эндотоксина для валидации депирогенизации».

Заключение.

Возможно, выбор эталонного стандарта, сделанный двадцать лет назад FDA и Фармакопеей США, оказался не самым удачным. Не исключено, что можно было выбрать другой штамм бактерии или другой способ очистки ЛПС. Но выбранный тогда стандарт был использован для установления главного – пороговой пирогенной дозы бактериальных эндотоксинов. Сегодня замена существующего стандарта другим препаратом будет означать необходимость повторения всех процедур проверки. Более того, это будет означать необходимость единовременного перехода всех производителей и пользователей на новый стандарт с полным отказом от старого. Эта операция может привести к полному разрушению существующей структуры контроля бактериальных эндотоксинов, и целесообразность такого действия далеко неочевидна.

На практику отечественного применения метода Международный стандарт оказывает самое прямое воздействие. Он принят в качестве стандарта эндотоксина ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины», активность его выражается в Единицах Эндотоксина – ЕЭ. Это означает, что результаты анализов, проведенные в соответствии с ОФС, выражаются в общепринятых единицах.

Что касается контрольных стандартов, то в отечественной практике, естественно, используются стандарты компаний – производителей ЛАЛ-реактива. Когда-то обсуждавшийся вопрос о целесообразности введения собственного стандарта (ГСО или РСО) более не поднимается. Вместе с тем, сегодня этот вопрос как раз и может быть актуальным. Вполне возможно отработать технологию получения собственного Контрольного стандарта эндотоксина, который может быть принят в качестве второго стандарта Фармакопеи или может просто использоваться наравне с КСЭ зарубежного производства.

Литература.

1. Pearson F.C., Weary M.E., Sargent H.S., et al. *Comparison of several control standard endotoxins to the national reference standard endotoxin –an HIMA collaborative study.* // *Appl. Environ. Microbiol.* -. 1985.- Vol. 50.- No.1.- P. 91-93.
2. Novitsky T. J. *Endotoxin standards.*//*Lal Update* – 1984.- Vol. 2.- No. 1.
3. Rudbach J.A., Akiya E.I., Elin R.J., Hochstein H.D., Luoma M.K., Milner E.C.B., Milner K.C., Thomas K.R.- *Preparation and properties of a national reference endotoxin.*//*J Clin Microbiol.*- 1976.- Vol. 3. – P. 21-25.
4. Novitsky T.J. *Selecting of the Standard* // *LAL Update.* - 1999. - Vol. 17. - No. 1.
5. Hochstein H.D., Mills D.F., Outschorn A.S., Rastogi S.C. *The processing and collaborative assay of a reference endotoxin.* // *J.Biol.Stand.* - 1983. - Vol. 11. - P. 251-260.
6. Hochstein HD *Review of the Bureau of Biologic's experience with Limulus amebocyte lysate and endotoxin.* // *Prog Clin Biol Res* - 1982. -Vol. 93. – P.141-151.
7. Frica J.R., Rudbach J.A. *Reference endotoxin. A practical rationale*// *Prog Clin Biol Res* -1982. -Vol. 93. - P. - 121-130.
8. Poole S., Mussett M.V., *The international standard for endotoxin: evaluation in an international collaborative study.* // *J. Biol. Stand* -1989. – Vol. 17. -P. 161-171.
9. Poole S., Dawson P., Gaines R.E. *Second international standard for endotoxin: calibration in an international collaborative study.*// *J. Endotoxin. Res.*- 1997.- Vol. 4. - No.3. - P. 221-231.
10. <85> *Bacterial Endotoxin Test*, p. 1165-1167. In: *United States Pharmacopoeia – Nation Formulary, 23 Revision, 1995, U.S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 1984*
11. *Guideline on validation of the Limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.* // *U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration.* - December - 1987.
12. <85> *Bacterial Endotoxins. Second Supplement to USP 24-NF 19. United States Pharmacopoeial Convention, Inc.; Rockville, MD, 1999 pp 1829-1831.*
13. Cooper J.F. *Harmonized BET is effective in 2001 for USP* // *LAL Times* - 2000.- Vol. 7. - No.1
14. Berzofsky R.N. *The road to international harmonisation.*// *LAL Review*- 2000. – Sept.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА, НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

Методы проведения анализа.

Ситников А. Г.

Бюллетень «ЛАЛ-Тест» №4(11) 2005, №1-2 (12-13) 2006.

I. Природа реакции и общая характеристика методов.

Введение ЛАЛ-теста в Фармакопею США 20 издания в 1980 году стало началом официального использования ЛАЛ-теста. Событие это произошло не на пустом месте, все предыдущее десятилетие активно отработывались концепция применения метода и способы проведения реакции. Тогда же обсуждалась и необходимость стандартизации ЛАЛ-реактива, КСЭ, методов проведения анализа. Стандартизировать тогда, действительно, было что. Одних только компаний-производителей ЛАЛ-реактива было около десяти. Вариантов же проведения ЛАЛ-теста было больше двух десятков. Особенно много было микрометодов, в которых реакция проводилась в микрокапиллярах, на предметных или часовых стеклах. Простое перечисление всех этих методов может занять целую страницу, вот некоторые из них:

- Гель-тромб тест;
- Турбидиметрический тест (по конечной точке);
- Хромогенный тест (по конечной точке);
- Кинетический турбидиметрический тест;
- Колориметрический (определение белка по Лоури);
- Радиоизотопный (использование меченого коагулогена);
- Гель-тромб тест на предметных стеклах (микрометод);
- Гель-тромб тест на предметных стеклах, оценка результатов после высушивания реакционных смесей (микрометод);
- Гель-тромб тест на предметных стеклах с использованием микрокапилляров для оценки результатов реакции (микрометод);
- Гель-тромб тест на предметных стеклах, оценка результатов после окрашивания реакционных смесей (микрометод) и т.д. Сегодня большая часть из предлагавшихся в середине 80-х годов способов проведения анализа уже забыта. Одни из них были слишком громоздкими или дорогими, как например, радиоизотопный или колориметрический. Микрометоды, при всей их внешней привлекательности, тоже не прижились как фармакопейные анализы. Слабой стороной микрометодов оказалось отсутствие четких и однозначных результатов, как, например, в пробирочном гель-тромб тесте. Другие методы напротив получили свое развитие, так хромогенный анализ оказался

довольно популярным, и к анализу по конечной точке добавилась кинетическая модификация хромогенного анализа. Вообще, период от середины 70-х до середины 90-х годов был временем накопления практического опыта. Ошибки исправлялись, тупиковые и бесперспективные направления постепенно отпадали. Меньше стало и компаний-производителей ЛАЛ-реактива, остались профессионалы, прекрасно ориентирующиеся в вопросах производства и практического использования ЛАЛ-реактива.

В гармонизированной статье «Бактериальные эндотоксины», принятой в 2000 году Европейской Фармакопеей, Фармакопеями США и Японии, был подведен, возможно, промежуточный итог развитию методологии ЛАЛ-теста. В статью вошло 6 разных методов проведения анализа:

- Метод А.
Качественный гель-тромб тест;
- Метод В.
Количественный гель-тромб тест;
- Метод С.
Кинетический турбидиметрический тест;
- Метод D.
Кинетический хромогенный тест;
- Метод Е.
Хромогенный тест по конечной точке;
- Метод F.
Турбидиметрический тест по конечной точке.

Каждый из этих методов имеет равные права и может быть использован для проведения контрольных анализов.

В первой части настоящей статьи мы подробно рассмотрим каждый метод и попытаемся оценить его достоинства и недостатки. Но прежде необходимо рассмотреть природу реакции ЛАЛ-реактива с ЛПС, без этого невозможно понимание сути различных способов регистрации содержания эндотоксина.

Система коагуляции мечехвостов очень похожа на системы коагуляции других животных и человека, но она имеет и отличия. Во-первых, все компоненты этой системы локализованы в клетках крови, в плазме факторов свертывания нет. Во-вторых, кровь мечехвостов содержит один-единственный тип циркулирующих клеток – амебоциты или гранулярные гемоциты. Архаичная система коагуляции мечехвостов обладает еще одной особенностью – реакция коагуляции инициируется только эндотоксинами грамотрицательных бактерий. Сочетание всех этих факторов и предопределило счастливую возможность использования реакции коагуляции мечехвостов *in vitro* для определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий.

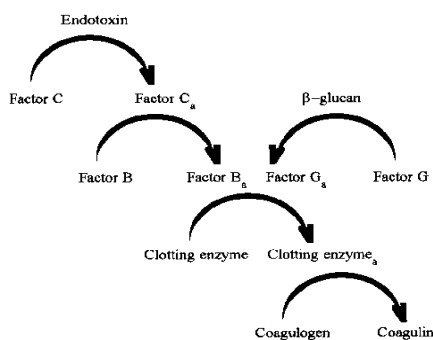


Рис. 1. Система коагуляции мечехвоста. (Iwanaga S., et.al. 1984)

На сегодняшний день все факторы коагуляции мечехвостов хорошо изучены и описаны. Система коагуляции состоит из пяти ферментов и белка-субстрата (Рис.1). Три фермента – Фактор С, Фактор В и Профермент составляют каскад свертывания, запускаемый эндотоксинами. Присутствие в лизате Фактора G определяет наличие альтернативного пути, который запускается β-глюканами. Конечный результат активации системы свертывания – переработка активного свертывающим ферментом белка-субстрата коагулогена. Коагулоген разрезается на несколько субъединиц, которые затем полимеризуются, образуя гель. Результат этой ферментативной реакции зависит от температуры, значения pH, концентрации ионов в реакционной смеси, времени проведения реакции и, самое главное, от концентрации эндотоксинов. Чем выше концентрация эндотоксина, тем активнее ферментная система, и тем быстрее происходит образование геля. Именно по этому все способы проведения ЛАЛ-теста так или иначе связаны с измерением активности ферментной системы, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна концентрации эндотоксина. Если быть точным, то речь идет об измерении активности свертывающего фермента – последнего фермента в каскаде. Наверное, поэтому в современной литературе и инструкциях можно встретить устаревшее представление о системе свертывания мечехвостов, состоящей всего из двух факторов: фермента (профермента) и субстрата (коагулогена) (Рис. 2).

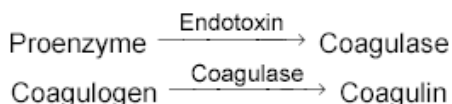


Рис 2. Система коагуляции мечехвоста, представленная всего двумя факторами свертывания

Активность фермента может быть измерена в конце predetermined периода инкубирования. На этом принципе основаны методы, определяющие конечную точку

реакции. Это оба варианта проведения гел-тромб теста, а также хромогенный и турбидиметрический анализы по конечной точке. Кинетические анализы основаны на измерении скорости активации этого фермента. Зависимость скорости реакции от концентрации эндотоксинов приведена на Рис.3. Чем выше концентрация эндотоксина, тем активнее ферментная система, тем меньше надо времени для переработки субстрата, тем круче кривая реакции. Можно также заметить, что рано или поздно весь субстрат, находящийся в лизате, будет переработан. Именно поэтому, все анализы, в которых проводится определение конечной точки реакции, имеют жесткие временные интервалы инкубирования.

Рассмотрим основные черты каждого из официальных фармакопейных методов.

Гель-тромб тест (Методы А и В).

Самый простой и самый известный из всех методов, в точности повторяющий реакцию коагуляции мечехвоста in vitro. ЛАЛ-реактив для гел-тромб теста - это вся ферментная система мечехвоста практически без каких-либо «переделок». В присутствии достаточного количества эндотоксина реакция доводится до логического конца – образования геля. Современное представление о процессе полимеризации коагулогена представлено на Рис. 4.

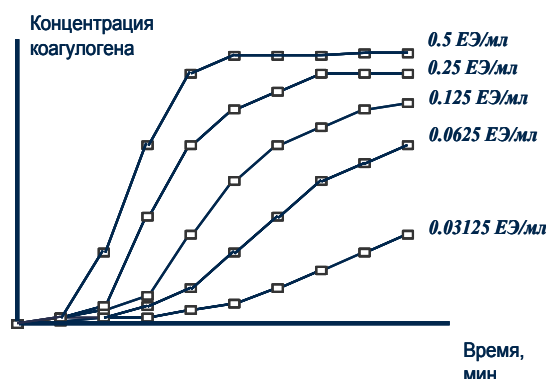


Рис.3. Зависимость скорости реакции от концентрации эндотоксинов.

Коагулоген разрезается на несколько субъединиц, которые объединяются между собой, образуя сначала длинные нити коагулина, далее эти нити за счет латеральной полимеризации образуют пространственную решетку геля. Чувствительность ферментной системы доводится производителем реактива до заданного значения, и эта чувствительность соответствует минимальной концентрации эндотоксина, с которой способен реагировать ЛАЛ-реактив в стандартных условиях проведения анализа. Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива определяет и чувствительность метода. Реактивы с максимальной чувствительностью позволяют определить концентрацию эндотоксина, равную 0,03 ЕЭ/мл. Компания **Charles River**

Endosafe выпускает реактив для гель-тромб теста с чувствительностью, равной 0,015 ЕЭ/мл. Впрочем, такой реактив может считаться промежуточным звеном между гель-тромб тестом и инструментальными анализами, практическая чувствительность которых не на много больше.

Обе модификации гель-тромб теста являются анализами по конечной точки реакции.

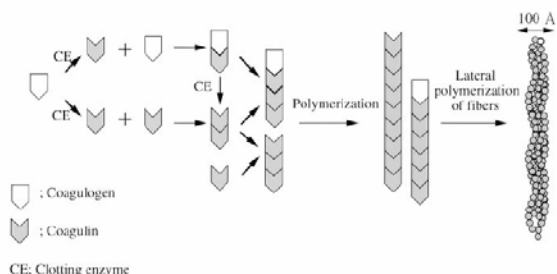


Рис. 4. Гипотетическая модель образования геля.

(Kawasaki H. et.al. 2000).

Метод А. Качественный гель-тромб тест. Это наиболее простой и экономичный метод проведения анализа. Для его проведения смешивают равные количества ЛАЛ-реактива и испытуемого препарата, затем реакционные смеси инкубируют 60 мин при температуре 37°C. Если в результате реакции получается твердый гель, то результат называется положительным и означает, что концентрация эндотоксина равна или более чувствительности ЛАЛ-реактива. Если гель не образуется, то результат отрицательный, и это означает, что концентрация эндотоксина менее чувствительности ЛАЛ-реактива.

Часто при первоначальном освоении метода возникают проблемы теоретического порядка. Некоторый парадокс качественного анализа заключается в том, что результаты могут быть интерпретированы только как «больше или равно» или «меньше». Желаемый результат анализа естественно «меньше», т.е. демонстрация отсутствия эндотоксина (точнее демонстрация того, что концентрация эндотоксина ниже ожидаемой). Вот и приходится при расчете степени разведения испытуемого препарата использовать в качестве отправной цифры такую концентрацию эндотоксина, которой в препарате не должно быть. Чем-то это напоминает поиски черной кошки в черной комнате.

Впрочем, данное обстоятельство нельзя назвать серьезным недостатком метода. Достоинствами же этого анализа являются простота проведения, минимум необходимого оборудования, хорошая воспроизводимость результатов. Ограничением метода является невозможность количественного определения концентрации эндотоксинов.

Метод В. Количественный гель-тромб тест. Для определения концентрации эндотоксина препарат последовательно разводят водой. Исходная концентрация эндотоксина в препарате постепенно снижается и, наконец, становится меньше чувствительности ЛАЛ-реактива. В опыте все разведения, в которых концентрация эндотоксина больше или равна чувствительности ЛАЛ-реактива, дают твердый гель. Разведения, в которых концентрация ниже, дают отрицательные результаты. Картина опыта может выглядеть следующим образом:

Разведения испытуемого препарата						
1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
+	+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-

По этим результатам видно, что в исходном растворе концентрация эндотоксина была больше чувствительности ЛАЛ-реактива, а в разведении 1/8 она стала равна чувствительности ЛАЛ-реактива. Следовательно, можно считать, что в исходном растворе концентрация эндотоксина была в восемь раз больше чувствительности ЛАЛ-реактива. Зная значение чувствительности, нетрудно рассчитать, чему равняется концентрация эндотоксина в препарате. Для этого фактор разведения (8) надо умножить на чувствительность (λ). В количественном анализе последнее разведение, в котором получен плотный гель (в примере это разведение 1/8), называют конечной точкой реакции для проверяемой серии разведений. Следует помнить, что это частное определение, а вообще гель-тромб тест (и качественный, и количественный) - это всегда анализ по конечной точке, т.е. в определенное время реакция останавливается, после чего регистрируются результаты анализа.

Количественный гель-тромб тест не обеспечивает высокой точности определения концентрации эндотоксинов. Допустимая ошибка метода составляет 50-200% от определенной величины. Т.е. реальная концентрация эндотоксинов в препарате может быть вдвое больше или вдвое меньше определенного в анализе значения. Поэтому в Европейской фармакопее **Метод В** называется полуколичественным анализом. Кстати сказать, полуколичественным является гель-тромб тест вообще вне зависимости от метода постановки анализа. Легко заметить, что Методы А и В очень похожи и принципиально друг от друга не отличаются. И деление на количественный и качественный анализ появилось сравнительно поздно. Первоначально гель-тромб тест рассматривался именно в редакции сегодняшнего Метода В, т.е. количественного анализа.

Количественный гель-тромб тест достаточно широко используется в научно-исследовательских работах. В то же время ценность этого анализа, как фармакопейного метода, не очень высока, поскольку он требует более длительной подготовки к анализу, и для его проведения необходимы значительные количества ЛАЛ-реактива. Для контрольного анализа вполне достаточно качественного ответа, и совсем необязательно знать, насколько концентрация эндотоксина выше или ниже установленной нормы.

Этот анализ является наиболее простым и доступным из всех способов количественного определения эндотоксинов. Он не требует ни специальной подготовки, ни специального оборудования. В ситуации, когда необходимо узнать концентрацию эндотоксина, проще всего поставить именно количественный гель-тромб тест. К ограничениям метода можно отнести невысокую точность определения концентрации эндотоксинов и необходимость постановки опыта для серии разведений, что приводит к большому расходу реактива.

Инструментальные методы проведения анализа.

Прежде чем детально разбирать особенности каждого из инструментальных методов, хочется обратить внимание на некоторые общие свойства, принципиально отличающие любой инструментальный анализ от гель-тромб теста.

Первое - все эти методы количественные и точность определения концентрации эндотоксинов у них значительно выше, чем у гель-тромб теста.

Второе - чувствительность методов или минимальная определяемая концентрация эндотоксинов может быть, как минимум, на порядок выше чувствительности гель-тромб теста.

Третье - многие инструментальные методы дают возможность определения концентрации в достаточно широком диапазоне. Определенные модификации инструментальных методов позволяют определить концентрацию эндотоксина в ряду от 0,001 ЕЭ/мл до 100 ЕЭ/мл (вопрос в том, насколько часто используется столь широкий диапазон, заслуживает отдельного рассмотрения). Это в частности означает, что для количественного определения эндотоксинов в препарате нет необходимости проверять серию его разведений. Одноединственного разведения препарата достаточно для получения количественного результата.

И, наконец, еще одна особенность этих методов - диапазон определяемых концентраций эндотоксина и максимальная чувствительность метода задаются непосредственно пользователем при построении калибровочной кривой. В гель-тромб тесте изменение чувствительности ЛАЛ-

реактива невозможно (точнее такая возможность не рассматривается).

Турбидиметрические анализы (Методы F и C).

Турбидиметрический тест можно в какой-то мере считать инструментальной версией гель-тромб теста. Для проведения этого анализа используется реактив, в принципе не отличающийся от реактива, используемого для гель-тромб теста. Соответственно и природа реакции та же, и конечный результат может быть таким же, т.е. образованием твердого геля. Однако реакция до конца не доводится. Предметом измерения является промежуточная стадия реакции, сопровождающаяся увеличением мутности реакционной смеси. Английское название метода: *Turbidimetric assay* (*turbid* - мутный, густой). Подобную картину можно наблюдать при постановке гель-тромб теста, когда гель за час не образовался, но раствор в пробирках мутный, густой, могут быть видны отдельные комки. Такое состояние реакционной смеси называют «кашей», и свидетельствует оно о том, что концентрация эндотоксинов близка к чувствительности ЛАЛ-реактива. Очевидно также, что визуально оценить интенсивность помутнения невозможно, для этой цели нужен прибор. Анализ, также как и гель-тромб тест, может быть проведен в стеклянных пробирках, в этом случае используются специальные приборы, например, *LAL-5000 (Associates of Cape Code)*. Не менее распространен и вариант проведения анализа в пластиковых микропланшетах с использованием универсальных спектрофотометров (ридиров) для микропланшет.

Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.

Анализ по конечной точке проводят в два этапа: сначала инкубируют реакционную смесь, затем измеряют оптическую плотность. Степень помутнения реакционной смеси прямо пропорциональна активности свертывающего фермента и, соответственно, содержанию эндотоксинов. Измерения делают при длине волны ниже 405 нм, обычно 340-350 нм. Калибровочная кривая строится по трем-четырем известным концентрациям КСЭ, Рис. 5. Если при проверке испытуемого образца значение оптической плотности укладывается в диапазон, определенный калибровочной кривой, можно рассчитать значение концентрации эндотоксинов в препарате. Чувствительность метода и измеряемый диапазон концентраций эндотоксинов зависят от времени инкубирования. Более длительное инкубирование позволяет определять концентрации эндотоксина, близкие к 0,001 ЕЭ/мл. Отношение наименьшей и наибольшей концентрации эндотоксина в определяемом диапазоне примерно 1:10, например, от 0,1 ЕЭ/мл до 1,0 ЕЭ/мл или от

0,5 ЕЭ/мл до 5,0 ЕЭ/мл. Если содержание эндотоксинов ниже или выше выбранного диапазона, оценка результатов анализа аналогична оценке результатов гель-тромб теста с той лишь разницей, что в гель-тромб тесте «меньше» или «больше» относится к единственной концентрации – значению чувствительности реактива, а в этом анализе «меньше» будет означать - менее нижней границы диапазона, а «больше» - более верхней границы измеряемого диапазона.

К достоинствам метода можно отнести то, что анализ может быть проведен на приборах без специальных инкубационных блоков, и для расчета результатов не нужно специального программного обеспечения. Но у этого метода есть и совершенно очевидные ограничения. Главной проблемой является невозможность остановить реакцию в заданное время. Это чисто техническая проблема, поскольку интервал времени, за который надо успеть провести измерение, очень ограничен. Повторно снять показания тоже не удастся. Это обстоятельство, пожалуй, и является основным недостатком метода, именно поэтому метод используется очень редко (если используется вообще). К недостаткам можно отнести и ограниченный диапазон определяемых концентраций, впрочем, это органическое свойство любого инструментального анализа по конечной точке.

Метод С. Кинетический турбидиметрический тест.

В кинетическом турбидиметрическом анализе также измеряется степень помутнения реакционной смеси. Однако в этом анализе важным является скорость изменения оптической плотности реакционной смеси. Если обратиться к схематичному представлению кинетики реакции на Рис. 3, легко заметить, что для более высоких концентраций эндотоксинов реакция идет быстрее. В основу кинетического метода положено измерение именно скорости реакции, точнее времени, необходимого для достижения заранее определенного (порогового) значения оптической плотности. Для проведения такой реакции необходимы приборы, которые позволяют одновременно инкубировать реакционные смеси и измерять их оптическую плотность. При проведении анализа считывание результатов проводится по каждой пробирке или лунке микропланшета через постоянные интервалы времени.

Измерения продолжают до достижения значения пороговой оптической плотности. Общее время проведения анализа обычно 60 мин, в отдельных пробах, в которых содержание эндотоксинов высокое, результаты могут быть получены гораздо раньше.

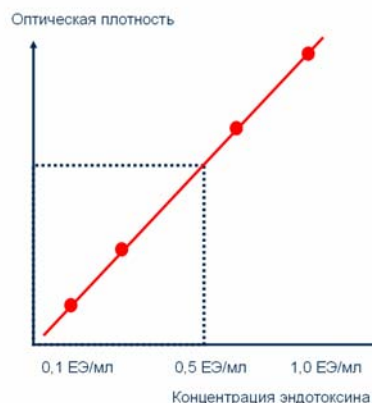


Рис. 5. Калибровочная кривая и использование ее для определения концентрации эндотоксинов.

Калибровочная кривая строится по нескольким концентрациям КСЭ. Измеряемый диапазон концентрации кинетического турбидиметрического метода очень широк, он может быть от 0,001 ЕЭ/мл до 100 ЕЭ/мл. Впрочем, такие широкие рамки, как правило, и не нужны, к тому же при меньшем разбросе концентрации точность определения выше. Функции измерения выполняет прибор, например, ридер или спектрофотометр, полученные данные обрабатываются специальными компьютерными программами. Фактически для проведения анализа используется сложный комплекс, состоящий из спектрофотометра, компьютера, программного обеспечения и принтера.

К достоинствам метода можно отнести очень широкий диапазон измерений и высокую чувствительность, кинетический турбидиметрический анализ считается наиболее чувствительным методом определения эндотоксинов. Аппаратное и программное обеспечение тоже можно отнести к достоинствам метода. Прибор контролирует температуру и время инкубирования. Программное обеспечение позволяет автоматизировать процедуру оценки и интерпретации результатов, программа автоматически генерирует протоколы анализа. Все полученные данные хранятся в виде архива. Эти достоинства имеют и обратную сторону, а именно, сравнительно высокую стоимость приборов и программ. Первоначальное освоение метода и программного обеспечения представляется несколько более сложным делом, чем освоение гель-тромб теста.

Хромогенные анализы (Методы Е и D).

ЛАЛ-реактив, предназначенный для проведения хромогенного анализа, значительно отличается от реактивов, предназначенных для проведения гель-тромб теста и турбидиметрического теста. В этом реактиве естественный субстрат - коагулоген заменен на искусственный хромогенный

субстрат. Этот субстрат состоит из полипептидной цепочки и хромофора р-нитроанилина (рНА). Типичная структура хромогенного субстрата представлена на Рис. 6.

BOC-Leu-Gly-Arg-CONH-□-NO₂

Рис. 6. Структура хромогенного субстрата.

Аминокислотная последовательность полипептида аналогична аминокислотной последовательности коагулогена, предшествующей разрезаемой свертывающим ферментом связи. Поэтому активный свертывающий фермент «по ошибке» разрезает эту связь, высвобождая хромофор р-нитроанилин, в результате чего в растворе развивается желтое окрашивание. Интактный же хромогенный субстрат бесцветен. Интенсивность окрашивания пропорциональна активности свертывающего фермента, которая в свою очередь зависит от концентрации эндотоксина. Максимум поглощения р-нитроанилина лежит в ультрафиолетовой области, однако оптическую плотность реакционной смеси обычно измеряют при длине волны 405 нм. Это связано с тем, что в близком ультрафиолете находятся максимумы поглощения многих соединений, поэтому оценка результатов анализа может быть затруднительна.

Хромогенный анализ проводится двумя методами, и для каждого из них предназначены специальные ЛАЛ-реактивы.

Метод Е. Хромогенный тест по конечной точке.

Как и все анализы по конечной точке хромогенный анализ проводится в два этапа: сначала проводится инкубирование, затем оценка результатов. Но в отличие от турбидиметрического анализа в данном анализе реакцию можно принудительно остановить и, следовательно, измерение не обязательно проводить немедленно. Это означает, что инкубирование и измерение оптической плотности может быть проведено на разном оборудовании, и для проведения измерения необязательно использование сложных приборов, оснащенных модулем инкубирования. Правда, процедура проведения анализа не очень проста. Обычно она складывается из нескольких этапов, жестко регламентированных по времени и связанных между собой. Последовательность может быть следующей:

1. Преинкубирование испытуемых и контрольных растворов;
2. Добавление ЛАЛ-реактива и инкубирование реакционных смесей;
3. Добавление к реакционным смесям хромогенного субстрата, продолжение инкубирования;
4. Остановка реакции;
5. Измерение оптической плотности.

До остановки реакции временные интервалы каждого этапа очень важны, от них зависит чувствительность опыта. Как правило, более длительное инкубирование позволяет определять более низкие концентрации эндотоксина.

Концентрацию эндотоксина можно рассчитать по калибровочной кривой, которая строится по нескольким концентрациям контрольного стандарта. Минимальная концентрация эндотоксина, которую можно определить с помощью хромогенного метода по конечной точке, составляет 0,005 ЕЭ/мл. Диапазон измеряемых концентраций и чувствительность определения задаются пользователем при построении калибровочной кривой. Как уже упоминалось выше, для всех анализов по конечной точке характерен не очень широкий диапазон измеряемых концентраций, обычно отношение минимальной и максимальной концентрации составляет 1:10. Другими словами, в конкретном опыте можно обнаружить эндотоксин в концентрации от 0,005 ЕЭ/мл до 0,05 ЕЭ/мл или от 0,01 ЕЭ/мл до 0,1 ЕЭ/мл и т.д.

Существует интересная модификация этого теста, в которой после остановки реакции высвободившийся пара-нитроанилин переводится в N-(1-нафтил-4-диазо-4-нитробензол) этилендиамин, который имеет ярко-красное окрашивание с максимумом поглощения при 545 нм. Этот способ позволяет не только увеличить чувствительность метода, но и дает возможность проверять образцы, имеющие желтое окрашивание.

Пожалуй, главным достоинством хромогенного анализа по конечной точке является простая процедура оценки результатов. Для расчета концентрации эндотоксина можно использовать калькулятор, электронные таблицы (MSExcel), а можно построить простую калибровочную кривую на миллиметровке. К недостаткам метода можно отнести достаточно сложную процедуру проведения реакции. В принципе этот анализ можно проводить и с реактивом, предназначенным для кинетического хромогенного анализа, в котором ЛАЛ-реактив лиофилизирован вместе с хромогенным субстратом. В этом случае процедура анализа значительно упрощается и включает только инкубирование образцов с ЛАЛ-реактивом и принудительную остановку реакции.

Метод D. Кинетический хромогенный тест.

В кинетическом хромогенном тесте инкубирование реакционных смесей и считывание результатов проводится одновременно. ЛАЛ-реактив, используемый для проведения этого анализа, содержит искусственный хромогенный субстрат. Поскольку считывание результатов проводится в ходе реакции, в

принудительной остановке реакции нет необходимости. По сути этот анализ ни чем не отличается от кинетического турбидиметрического теста, хотя для его проведения используют другую реактив, и измерения делаются при другой длине волны.

Для проведения анализа необходимо специальное оборудование и программное обеспечение. Анализ практически всегда проводится на микропланшетах, в этом случае используется спектрофотометр Bio-Tek ELx808 или аналогичный.

Для учета и обработки результатов необходимо программное обеспечение. Калибровочная кривая строится по нескольким точкам, диапазон измерения может быть очень широким от 0,005 ЕЭ/мл до 50 ЕЭ/мл (Рис. 7).

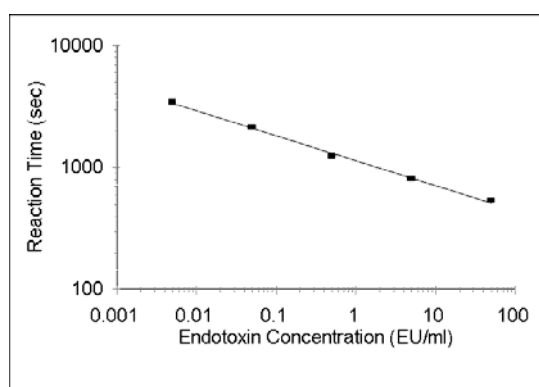


Рис. 7. Кинетический хромогенный тест, калибровочная кривая, ось x — концентрация эндотоксина, ось y — время реакции.

К достоинствам метода можно отнести широкий диапазон измеряемых в анализе концентраций, высокую чувствительность к эндотоксинам, возможность автоматизации процедуры проведения анализа и обработки результатов, связанную с использованием специализированного оборудования и программ. Впрочем, последнее можно отнести и к недостаткам, поскольку стоимость такого измерительного комплекса может быть достаточно высокой.

II. Реактивы, их характеристики, сравнение методов.

ЛАЛ-реактивы, предназначенные для проведения анализа различными методами.

Для разных методов проведения анализа выпускаются разные реактивы. Если систематизировать все известные сегодня ЛАЛ-реактивы по признаку их использования в том или ином методе, можно выделить группы реактивов, предназначенных для проведения следующих анализов:

- гель-тромб теста;
- кинетического турбидиметрического теста;
- хромогенного теста по конечной точке;

- кинетического хромогенного теста.

Следует обратить внимание на то, что список реактивов не полностью соответствует списку методов. Так, для обоих вариантов гель-тромб теста используется один и тот же реактив. Реактивов, специально предназначенных для проведения турбидиметрического теста по конечной точке, нет. А для каждого варианта проведения хромогенного анализа есть свой ЛАЛ-реактив. Примененный признак систематизации метод/реактив вполне понятен сегодня, хотя исторически развитие методологии шло за развитием реактивов и приборного обеспечения. В первую очередь, конечно реактивов. Классический ЛАЛ-реактив, который получали еще Левин и Банг в середине 60-х годов, использовали для проведения пробирочного анализа, который называли гель-тромб тест (*gel clot assay*). Позже этот же реактив стали использовать для проведения количественного спектрофотометрического определения эндотоксинов (определение белка по Лоури), но этот метод не прижился. Возможность постановки анализа на универсальных лабораторных спектрофотометрах (ридерах), позволяющих проводить измерения в течение всего времени инкубирования, привело к появлению кинетического турбидиметрического анализа (*kinetic turbidimetric assay*). В 1977 году появилось первое упоминание о возможности использования хромогенного субстрата для оценки активности ферментной системы. Так появился новый метод — хромогенный тест (*chromogenic assay*), который поначалу был только анализом по конечной точке. Как только появился реактив, позволяющий проводить хромогенный анализ в один этап (за одно инкубирование), сразу возникла и кинетическая разновидность хромогенного теста, изменилась и терминология. Хромогенный анализ стали разделять на два анализа: по конечной точке и кинетический.

Сегодня, решая, как проводить анализ, мы сначала выбираем метод и оцениваем, какое оборудование необходимо для его проведения. Таким образом, автоматически решается вопрос с типом реактивов, которые будут далее использоваться. На заключительном этапе предстоит выбрать производителя реактивов, торговую марку, поставщика, но это все вопросы технические. И все же иногда полезно видеть картину «наоборот», поэтому в Приложении к статье мы приводим сводную таблицу со списком реактивов и перечислением методов проведения анализа, для которых эти реактивы предназначены. Стоит обратить внимание на то, что область применения некоторых реактивов очень обширна, другие же наоборот позволяют работать только одним методом.

Мы будем рассматривать свойства разных ЛАЛ-реактивов, придерживаясь более понятной сегодня системы «раскладывания по полочкам»: сначала метод, потом реактив, который для него предназначен. Разные производители выпускают реактивы для проведения официальных фармакопейных анализов, и основные характеристики их очень схожи. Все же у них есть и некоторые особенности, наиболее заметные из которых мы рассмотрим ниже.

Реактивы для гель-тромб теста отличаются очень большим разнообразием, причем не только по чувствительности, но и по вариантам фасовок от флаконов на 50 определений (5,2 мл) до разовых пробирок на одно определение. Впрочем, эти характеристики, как и способы разведения и хранения реактивов для гель-тромб теста, хорошо известны большинству наших читателей, поэтому мы не будем на них останавливаться подробно. Отметим только, что из всех прочих реактивов они наиболее стабильны при хранении (конечно настолько, насколько понятие стабильность применимо к белковым препаратам). Стандартные сроки годности лиофилизированного ЛАЛ-реактива составляют 3-5 лет с момента выпуска. Реактив отличается хорошей стабильностью при хранении и транспортировке. После разведения он может храниться сутки при 2-8°C и от 30 до 90 суток в замороженном виде.

Неотъемлемой характеристикой реактивов для гель-тромб теста является чувствительность (λ), которая выражается в ЕЭ/мл. Чувствительность ЛАЛ-реактива определяет и чувствительность метода или, в частном случае, наибольшую чувствительность проводимого определения. Выбирая реактив с чувствительностью 0,06 ЕЭ/мл или 0,25 ЕЭ/мл, мы определяем максимальную чувствительность всех дальнейших определений.

Реактивы для кинетического турбидиметрического теста поставляются обычно во флаконах на 50 определений (5,2 мл). Более мелких фасовок практически не встречается. По стабильности они похожи на реактивы для гель-тромб теста. В разведенном виде реактивы могут храниться 24 часа при 2-8°C или от 28 суток до 3 месяцев в замороженном виде. Размораживать их можно тоже только один раз. О тесной связи турбидиметрического и гель-тромб тестов свидетельствует существование специальных реактивов, с помощью которых возможно проведение анализа обеими методами.

Наиболее заметное отличие реактивов, предназначенных для проведения кинетических анализов, заключается в том, что для них не указывается чувствительность. Чувствительность, точнее диапазон измерения, определяется пользователем при построении калибровочной кривой. Используя

один и тот же реактив, можно построить калибровочную кривую для серии стандартов, например 0,01 - 100 ЕЭ/мл или 0,5 - 50 ЕЭ/мл. В первом случае максимальная чувствительность определения (она же чувствительность ЛАЛ-реактива в опыте, λ) будет равна 0,01 ЕЭ/мл, во втором случае она будет равна 0,5 ЕЭ/мл. Время проведения анализа зависит от наименьшей концентрации стандарта эндотоксина, используемой для построения калибровочной кривой. Обычно оно колеблется от 30-35 минут до одного часа, иногда и более.

Минимальная концентрация эндотоксина, определяемая в турбидиметрическом анализе, зависит как от свойств реактива, так и от оборудования, используемого для проведения анализа. Так по данным, приведенным в соответствующих инструкциях, она составляет:

- для реактива Pyrotell-T - 0,001 ЕЭ/мл (при условии использования специального оборудования);
- для реактива Endosafe KTA2- 0,005 ЕЭ/мл;
- для реактива Pyrogen-5000 - 0,01 ЕЭ/мл.

Принято считать, что для кинетического турбидиметрического анализа стандартным минимумом определяемой концентрации эндотоксина является 0,005 ЕЭ/мл.

Первые наборы для проведения хромогенного анализа по конечной точке появились в середине 80-х годов. Для проведения такого анализа использовался (и используется сегодня) целый набор реактивов, в который входят ЛАЛ-реактив, хромогенный субстрат и буферные растворы. Анализ проводится в несколько этапов: в процессе первого инкубирования происходит активация ферментной системы, затем к реакционной смеси добавляют искусственный субстрат. Через определенное время (второе инкубирование) в растворе развивается окрашивание, затем реакцию принудительно останавливают и измеряют интенсивность этого окрашивания. В теории все достаточно просто, на практике для проведения такого анализа необходима очень хорошая подготовка аналитика, от которого требуется кроме всего прочего еще и умение точного и быстрого дозирования растворов, поскольку все временные интервалы (первое и второе инкубирование) очень важны. Хромогенный анализ по конечной точке считается наиболее сложным в проведении анализом именно с точки зрения техники работ. В тоже время он наименее требователен к приборному и программному обеспечению.

Минимальные концентрации эндотоксина, определяемые в хромогенном анализе по конечной точке, составляют порядка 0,01-0,015 ЕЭ/мл. Измерения проводят в относительно узком диапазоне концентраций.

ЛАЛ-реактив для кинетического хромогенного анализа сначала

рассматривался как усовершенствованный реактив для анализа по конечной точке. Этот реактив представляет собой смесь ЛАЛ-реактива, буфера и хромогенного субстрата, лиофилизированных в одном флаконе. Цели разработчиков этого реактива были вполне понятны: они стремились сократить количество операций, необходимых для проведения анализа. Этот реактив позволил проводить хромогенный анализ в одно инкубирование, который так и называли сначала - «хромогенный анализ, проводимый в один этап» (*single-step chromogenic assay*). Однако возможности этого реактива оказались гораздо шире, он позволил проводить измерение кинетики реакции, аналогично кинетическому турбидиметрическому тесту. В результате появилась новая редакция кинетического анализа - кинетический хромогенный тест. Этот анализ оказался гораздо более удобным, чем анализ по конечной точке. Достаточно сказать, что диапазон измерения у кинетического анализа на несколько порядков шире, чем у анализа по конечной точке.

Реактивы, используемые для проведения хромогенных анализов, представляют собой полусинтетические ЛАЛ-реактивы. Хромогенную реакцию можно разделить на два этапа: первый - активация ферментной системы под действием эндотоксина, которая завершается переводом профермента в активную форму. В этой фазе реакции работают «естественные» компоненты системы коагуляции, и оптимальным значением pH для нее является 6,0-7,5 (стандартные значения, указанные для всех ЛАЛ-реактивов). На втором этапе свертывающий фермент должен перерабатывать искусственный субстрат, и оптимально pH этой реакции находится в ряду 8,0-9,0. Возможно, по этой причине анализ по конечной точке, проходящий в несколько стадий, более точно обеспечивает создание оптимальных условий для каждого из этапов. Реактив для кинетического анализа можно назвать «компромиссным» и, возможно, не идеальным, поскольку pH реактива несколько сдвинут в щелочную сторону. Но компромисс этот оказался вполне приемлемым, так как кинетический анализ обеспечивает и высокую чувствительность определения, и хорошую стабильность результатов. Во многих случаях он в значительно меньшей степени подвержен ингибированию, чем турбидиметрический анализ. Не исключено, что это связано с тем, что в хромогенном ЛАЛ-реактиве количество субстрата строго определено производителем, в отличие от обычного ЛАЛ-реактива, в котором концентрация коагулогена зависит от множества факторов, контролировать которые при производстве реактива просто невозможно.

Наверное, любое достоинство имеет свою обратную сторону, в данном случае за стабильность результатов приходится платить

относительно коротким сроком хранения разведенного ЛАЛ-реактива для хромогенного анализа (несколько часов при 2-8°C и обычно только две недели после заморозки), поэтому такой реактив поставляется во флаконах по 2,5-3,0 мл, в отличие от обычных флаконов на 5,0 мл для геля-тромб теста и турбидиметрического теста.

Интересно отметить, что ЛАЛ-реактивы, предназначенные для проведения кинетического хромогенного анализа и, в известной степени, методики работы с ними, предельно стандартизованы и мало отличаются у разных производителей. Так, минимальная концентрация эндотоксина, определяемая с помощью реактива любого производителя, составляет 0,005 ЕЭ/мл. И все они оптимизированы для построения калибровочных кривых от минимальной концентрации 0,005 ЕЭ/мл до максимума, соответствующего концентрации 50 ЕЭ/мл. Оборудование для проведения этого анализа тоже в максимальной степени стандартизовано.

Сравнительная характеристика различных методов.

Обзор разных методов проведения анализа невозможен без их сопоставительной характеристики. Но, прежде чем сравнивать разные анализы, хотелось бы ограничить их число, поскольку далеко не все они представляют интерес как фармакопейные анализы, хотя в основные Фармакопеи включены шесть методов проведения анализа. И, тем не менее, если провести самую поверхностную оценку различных методов, условий их проведения и необходимого для этого оборудования, становится понятным, что некоторые методы можно назвать «теоретически возможными», существующими в основном на бумаге. В первую очередь это относится к турбидиметрическому анализу по конечной точке. Такой анализ может быть проведен, но, учитывая то, что реакция не останавливается, становится очевидным, что провести его можно только на приборе, который одновременно может инкубировать микропланшеты и проводить измерение состояния реакционных смесей. Если такой прибор есть, то на нем гораздо целесообразнее проводить кинетическую модификацию турбидиметрического анализа хотя бы потому, что в этом случае диапазон измеряемых в опыте концентраций эндотоксинов может быть в 100 раз большим, чем при анализе по конечной точке. Не удивительно, что турбидиметрический анализ по конечной точке не фигурирует в методиках и в НД на импортные препараты (и тем более в отечественных ФСП). В хромогенном анализе по конечной точке измерения делаются после принудительной остановки реакции, но и этот метод имеет существенные недостатки - ограниченный диапазон измерений и достаточно сложная процедура

проведения анализа. Представляется, что такой анализ может быть приемлемым для научно-исследовательской лаборатории, где есть приборы, которые можно приспособить под задачу определения эндотоксинов, и где эти анализы проводятся редко. В тоже время, если перед заводским ОКК или перед контрольной лабораторией стоит вопрос постановки количественного инструментального анализа впервые, то гораздо разумнее приобретать оборудование для проведения кинетических анализов, тем более, что и хромогенный, и турбидиметрический кинетические анализы могут быть проведены на одном и том же оборудовании.

Что касается гель-тромб теста, то надо признать, что две его модификации принципиально друг от друга не отличаются и проводятся на одном и том же оборудовании. Уже не раз отмечалась некоторая уязвимость определений - количественным гель-тромб тест называть в принципе нельзя вне зависимости от способа его проведения. Вообще, деление гель-тромб теста на количественный и качественный анализы можно назвать условным и рассматривать их можно как один метод.

Принимая во внимание вышесказанное, сравнивать между собой имеет смысл следующие методы:

- гель-тромб тест;
- кинетический хромогенный тест;
- кинетический турбидиметрический тест.

Остановимся на нескольких, как нам кажется, ключевых характеристиках, а именно на чувствительности (и диапазоне измерения в части кинетических анализов), точности определения концентрации эндотоксина и корреляции этих результатов, а также подверженности этих методов ингибированию со стороны испытуемого препарата.

Чувствительность методов/рабочие диапазоны измерения разных методов.

Как ни парадоксально может показаться, но по чувствительности все методы вполне сопоставимы между собой. Конечно, кинетические анализы позволяют определять бактериальные эндотоксины в очень низких концентрациях: 0,005 ЕЭ/мл и до 0,001 ЕЭ/мл, но с практической точки зрения такая чувствительность редко бывает востребована. Например, при проверке Диклофенака, раствор для инъекций 25 мг/мл, содержание бактериальных эндотоксинов не более 2,33 ЕЭ/мг или 58,25 ЕЭ/мл, МДР для разных методов будет составлять:

Гель-тромб тест ($\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл) - 1 864;

Кинетический хромогенный или турбидиметрический тест ($\lambda = 0,005$ ЕЭ/мл) - 11 650;

Кинетический турбидиметрический тест ($\lambda = 0,001$ ЕЭ/мл) - 58 250.

Возникает вопрос: зачем разводить препарат в 58 000 раз, сколько ошибок можно наделать, готовя такое разведение, и что в этом разведении от препарата останется? Ведь задачей проверки является обеспечение (или контроль) качества препарата и, желательнее, с достаточным уровнем безопасности полученного результата. В этом смысле вполне приемлемым может быть результат, свидетельствующий, что содержание эндотоксина в препарате равно или меньше 5 ЕЭ/мл или даже 0,5 ЕЭ/мл (определение уровня безопасности - задача того, кто планирует анализ). Эти значения регистрируются любым методом, при условии, что определению не мешает ингибирование. Поэтому высокая чувствительность кинетических анализов необходима далеко не всегда, в этих анализах при построении калибровочных кривых вполне можно ограничиться минимальной концентрацией 0,01-0,05 ЕЭ/мл, что сопоставимо с чувствительностью ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста.

Большим достоинством кинетических анализов является возможность самостоятельно определять чувствительность (λ) любого конкретного анализа. Можно использовать высокую чувствительность или отказаться от нее, когда в этом нет необходимости. И все это можно проводить с одним и тем же флаконом реактива. В случае гель-тромб теста переход на другую чувствительность требует значительно больших усилий.

В кинетических анализах понятие *определяемой в опыте концентрации эндотоксинов* выходит за рамки привычных для гель-тромб теста определений. В гель-тромб тесте оно соответствует чувствительности метода, точнее, чувствительности ЛАЛ-реактива (λ). В кинетических анализах за λ принимается *наименьшая концентрация КСЭ, используемая для построения калибровочной кривой*. Есть еще и наибольшая концентрация КСЭ и, соответственно, *диапазон концентраций*, в котором возможно определение содержания эндотоксинов. В кинетических анализах этот диапазон потенциально очень широк. Согласно инструкциям по применению различные ЛАЛ-реактивы для кинетических анализов позволяют получать результаты в диапазонах 0,01 - 100 ЕЭ/мл, 0,005 - 50 ЕЭ/мл и даже 0,001 - 100 ЕЭ/мл. Таким образом, разница между минимальной и максимальной концентрациями может быть в 10 000 или 100 000 раз. Это очень много и заманчиво, так, если бы приведенный выше в качестве примера препарат Диклофенак совсем не ингибировал реакцию, можно было бы, проверив его исходный раствор, принять решение по качеству серии, причем по

совершенно конкретному, количественно определенному значению содержания эндотоксинов в препарате. Однако с практической точки зрения калибровочные кривые с таким широким диапазоном строить нецелесообразно, поскольку снижается точность определения и значительно увеличивается время реакции. Лучше, опираясь на опыт предыдущих анализов или на собственный здравый смысл, выбрать диапазон измерения более узкий, но обеспечивающий получение приемлемых и информативных результатов. Например, можно было бы проверить препарат в диапазоне концентраций 0,1 - 10 ЕЭ/мл. В этом случае анализ занимает меньше времени, и снижается расход реактивов. Если реальное содержание эндотоксинов не попадает в выбранный диапазон, выводы будут аналогичны выводам, обычным для качественного гель-тромб теста: больше или меньше. Но в случае кинетического анализа «меньше» значит меньше минимальной концентрации КСЭ, а «больше» значит больше максимальной концентрации КСЭ, которые были использованы для построения калибровочной кривой.

Измерение в широком диапазоне концентраций очень полезно, когда проводится проверка неизвестного препарата, субстанций, вспомогательных материалов, смывов с поверхности оборудования и т.д., другими словами, когда содержание эндотоксинов предсказать заранее невозможно, или нет четких норм их содержания.

Все сказанное означает, что сравнивать надо не только «паспортные» характеристики методов. Методы следует рассматривать с точки зрения их практического применения и целесообразности использования их свойств. Сравнивая методы между собой по чувствительности, можно констатировать, что оба кинетических анализа равнозначны по этому параметру, гель-тромб тест им несколько уступает. Главное то, что потенциальные возможности кинетических методов очень широки, гель-тромб тест используется, если так можно выразиться, на пределе его возможностей.

И, наконец, еще одно практическое замечание, которое может проиллюстрировать все выше приведенные рассуждения о чувствительности и диапазонах измерения.

Даже при проверке воды для инъекций с помощью кинетических методов рекомендованным диапазоном измерения является 0,01 ЕЭ/мл - 1 ЕЭ/мл (Cooper 1998).

Точность определения концентрации эндотоксинов.

Количественные результаты, полученные с помощью разных методов, как правило, сопоставимы. Хотя результаты проверки одного и того же препарата разными методами

могут заметно отличаться друг от друга. Например, при проверке получены следующие значения концентрации эндотоксина:

- Гель-тромб тест - 4,0 ЕЭ/мл;
- Кинетический турбидиметрический тест - 2,2 ЕЭ/мл.

Результаты разные, но они не противоречат друг другу, если принять во внимание допустимую ошибку (доверительные интервалы) каждого из методов.

Для гель-тромб теста точность определения составляет 50-200% от полученной величины. В данном случае учитывается полуколичественная природа самого анализа и способ калибровки ЛАЛ-реактива.

Для инструментальных методов точность определения значительно больше, но при оценке результатов допускается довольно большой разброс значений. Анализ считается достоверным, если точность определения концентрации КСЭ (при построении калибровочной кривой) составляет $\pm 50\%$ (в определенных случаях $\pm 25\%$) от известной величины, а допустимая точность определения концентрации КСЭ в положительном контроле испытуемого образца составляет те же 50-200%. В случае количественных анализов эти рамки носят скорее искусственный характер и относятся не столько к технике измерения, сколько к непредсказуемости поведения эндотоксина в разных растворах. Получается, что к точно измеренной активности КСЭ (а тем более «естественных» эндотоксинов) нужно относиться с некоторой долей скепсиса, поскольку активность эта может быть разной в разных ситуациях.

Поэтому в приведенном примере по результатам гель-тромб теста концентрация эндотоксина может находиться в ряду 2,0 - 8,0 ЕЭ/мл. Для кинетического анализа, если оценивать точность определения по допускам, принятым для положительного контроля ($\pm 50\%$), определенная в анализе концентрация эндотоксина может находиться в ряду 1,1 - 3,3 ЕЭ/мл.

Легко заметить, что у этих двух анализов есть общий диапазон значений концентрации эндотоксина в препарате 2,0 - 3,3 ЕЭ/мл. Можно сказать, что результаты двух разных методов уточняют друг друга, позволяя правильнее оценить реальное содержание эндотоксина в препарате.

Ингибирование реакции.

Ингибирование реакции со стороны испытуемого препарата - это проблема, возникающая довольно часто. Так, для приведенного в качестве примера раствора Диклофенака д/и ингибирование в гель-тромб тесте может быть снято в разведениях в 100 - 200 раз, а в определенных ситуациях и в больших. Часто именно ингибирование не дает возможности определить концентрацию

эндотоксинов. Для Диклофенака, проверенного в гель-тромб тесте, стандартным ответом является менее 3,0 ЕЭ/мл или 6,0 ЕЭ/мл, а насколько «менее» неизвестно по причине ингибирования.

В разных методах ингибирование проявляется по-разному, точнее снимается в разных разведениях. В качестве иллюстрации можно привести следующий пример:

	Penicillin (200,000 Units/ml)	Clindamycin (150 mg/ml)
Gel-clot	1:16	1:32
Endpoint Chromogenic	1:10	1:20
Kinetic Turbidimetric	1:200	1:100

Степень разведения, необходимая для преодоления ингибирования.

(Dawson M.E. A wealth of options. Choosing an LAL test method. LALUpdate. 1995.,V.13.,No.3)

В этом примере наименее чувствительным к ингибированию оказывается хромогенный тест по конечной точке, наиболее чувствительным является кинетический турбидиметрический тест. Цифры, обозначающие степень минимального разведения, при котором снимается ингибирование, мало что значат. Рассматривать их необходимо только в связи с другими цифрами - значениями МДР, которые также различны для разных методов:

	Sensitivity (λ) (EU/ml)	Penicillin	Clindamycin
Gel-clot	0.03	640	2,784
Endpoint Chromogenic	0.005	4,000	17,400
Kinetic Turbidimetric	0.001	20,000	87,000

Значение МДР в зависимости от чувствительности метода.

(Dawson M.E. A wealth of options. Choosing an LAL test method. LALUpdate. 1995.,V.13.,No.3)

При расчете МДР использованы значения максимально возможной чувствительности по каждому из методов. Следует помнить, что ингибирование в кинетическом турбидиметрическом методе во многом зависит от оборудования и техники эксперимента. В приведенных выше таблицах использованы данные по модификации турбидиметрического теста, проводимого в пробирках. В таком анализе отношение объемов испытуемого препарата и ЛАЛ-

реактива составляет 4:1. Относительно меньшая концентрация ЛАЛ-реактива в реакционной смеси оказывается причиной ингибирования и заставляет проводить дополнительные разведения испытуемого препарата. В тоже время в этой модификации предельная чувствительность анализа составляет 0,001 ЕЭ/мл, что дает значение МДР, наибольшее из возможных. В известном смысле эта модификация турбидиметрического анализа одновременно порождает проблему и дает средство для ее разрешения. Другая модификация турбидиметрического анализа, проводимого на микропланшетах, использует стандартные отношения объемов препарата и ЛАЛ-реактива - 1:1, и в этом случае ингибирование со стороны препарата преодолевается примерно в тех же разведениях, что и для гель-тромб теста. Необходимо отметить, что появились специализированные приборы для пробирочной версии анализа, позволяющие проводить измерения для стандартных объемов реакционной смеси.

Из трех рассматриваемых методов трудно выделить какой-либо один, полностью решающий проблему ингибирования. Создается впечатление, что гель-тромб тест в меньшей степени ему подвержен. Но возможно, что это просто следствие довольно высокой концентрации КСЭ (2 λ) в положительном контроле испытуемого образца, которая оценивается качественно. В кинетических анализах концентрация эндотоксина в положительном контроле испытуемого образца оценивается количественно, и полученное значение сравнивается с теоретически известной концентрацией КСЭ. Это обстоятельство является безусловным плюсом, поскольку в этом случае, возможно, увидеть не только ингибирование, но и усиление реакции, и на оценку результатов не влияет фоновое содержание эндотоксинов в испытуемом препарате.

III. Оборудование, необходимое для проведения инструментальных анализов.

Приборы

Для проведения инструментальных анализов обычно используются не одиночные приборы, а целый измерительный комплекс. Такой комплекс может быть достаточно сложным, особенно это относится к кинетическим анализам. Основной его частью является спектрофотометр (ридер), позволяющий инкубировать реакционные смеси и считывать результаты. Использоваться могут как приборы, позволяющие проводить анализ в стеклянных пробирках, так и ридеры, предназначенные для работы с микропланшетами.

К первой группе относятся узкоспециализированные приборы, созданные практически под одну задачу, - проведение ЛАЛ-теста, причем в одной его модификации - кинетического турбидиметрического анализа. В качестве примера можно привести приборы **LAL-5000** и **PyrosKinetix** (*Associates of Cape Code*). Внешне они напоминают твердотельные термоблоки, только большего размера. Кстати, они могут быть использованы и как термоблок для проведения геля-тромб теста. Прибор имеет 32 - 96 лунок для пробирок, соответственно, количество проводимых одновременно анализов может быть достаточно большим. После помещения пробирок в прибор начинается их инкубирование и одновременно считывание результатов. Данные передаются на компьютер и обрабатываются специальной программой. Именно для этого прибора создан ЛАЛ-реактив **Pyrotell-T** и специальное программное обеспечение **PyrosKinetix** (*Associates of Cape Code*).

Считается, что наибольшей чувствительности определения (0,001 ЕЭ/мл) можно добиться именно с помощью этой системы (приборы LAL-5000 или PyrosKinetix, стеклянные пробирки, реактив Pyrotell-T, ПО PyrosKinetix). В определенном смысле такую систему можно было бы назвать идеальной, если бы не общий недостаток всех идеальных систем - слишком жесткая привязка к одному единственному методу и реактиву.

Альтернативным вариантом являются ридеры для микропланшет. Это универсальные приборы, которые могут быть использованы для проведения различных анализов и, в том числе ЛАЛ-теста. Обычно, это ридеры **Bio-Tek** или **Tecan Sunrise**. Системы проведения анализов, построенные на основе ридеров для микропланшет, как правило, оказываются более гибкими и универсальными. Важным является то, что эти приборы дают возможность проводить анализ с помощью четырех различных методов:

- Метод С. Кинетический турбидиметрический тест;
- Метод D. Кинетический хромогенный тест;
- Метод E. Хромогенный тест по конечной точке;
- Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.

Ридер **Bio-Tek ELx808IU** является базовой моделью, на которую ориентированы все производители ЛАЛ-реактивов, и следовательно, на этом приборе можно проводить не только разные анализы, но и использовать реактивы разных производителей.

Программное обеспечение

К числу программ, созданных специально для проведения различных инструментальных методов, можно отнести следующие программы:

- **WinKQCL (Cambrex Bio Science);**
- **Pyrosoft-11 (Associates of Cape Cod);**

- **PyrosKinetix (Associates of Cape Cod);**
- **EndoScan-V (Charles River Endosafe);**
- **Biotrend (Charles River Endosafe).**

Программа **PyrosKinetix** упоминалась выше, она предназначена только для проведения анализа турбидиметрическим кинетическим методом. Остальные программы в той или иной степени универсальны. Они позволяют проводить разные анализы, а некоторые и работать с реактивами разных производителей. Эти пакеты программ позволяют управлять разными приборами, причем любая из них работает с упомянутым выше ридером **Bio-Tek ELx808IU**.

Архитектура программ разных производителей различна. Это может быть программа, сочетающая в себе максимум функций: сбор и обработка результатов, статистическая обработка, хранение больших архивов данных. Есть программы, представляющие собой отдельные модули, которые могут работать как самостоятельно, так и вместе. В первом случае пользователь получает программный продукт «на все случаи жизни», во втором он может наращивать функциональные возможности тогда, когда эти «случаи» возникают. Несмотря на разницу подходов, принципиальных отличий у программ нет, стоимость одной большой программы и программы, составленной из нескольких самостоятельных модулей, тоже примерно одинакова.

Надо признать, что первоначальное освоение программ может вызвать трудности. К тому же, все они, к сожалению, англоязычны, и локализованных версий ждать не приходится. Зато после освоения работа доставляет удовольствие. Программы используют привычный оконный интерфейс, большинство команд меню (во всяком случае, пиктограммы на кнопках) известны всем, кто работает на компьютере. Такие функции, как использование шаблонов, автоматическое создание повторностей, автоматическое создание положительного контроля дают возможность за считанные минуты создать карту микропланшеты. В процессе измерения программа позволяет просматривать изменения, происходящие в каждой лунке. Ход реакции можно наблюдать в реальном времени и при наличии определенного опыта можно понять, какими будут результаты еще до конца анализа.

После завершения измерений программа автоматически обчисляет результаты, строит калибровочную кривую, определяет концентрацию эндотоксинов в испытуемых образцах и анализирует достоверность результатов по нескольким критериям. Отчет об опыте (протокол) генерируется автоматически, он может включать различные параметры, некоторые из них определяются пользователем. Наконец, этот отчет можно не

только распечатать, но и послать по электронной почте или по факсу. Эти операции программа может проделать самостоятельно, главное, чтобы ПК был подключен к сети или телефонной линии.

Еще одна любопытная характеристика программ. Все они соответствуют современным требованиям FDA, предъявляемым к программному обеспечению (CFR Part 21), цель которых: «... определить критерии, по которым FDA может считать электронные данные эквивалентом печатной документации, а электронные подписи – эквивалентом традиционной подписи на бумаге». Эти комплексные правила в частности исключают возможность изменения результатов опыта, внесения исправлений, несанкционированное обращение к программе и т.д.

Заключение

Выше уже не раз упоминалось, что из шести описанных в фармакопеех методов наиболее популярными и используемыми являются три метода: гель-тромб тест и оба варианта кинетических анализов. Приводя характеристики методов и сравнивая их между собой, мы старались не делить методы на плохие и хорошие. Все зависит от конкретной ситуации и задач, которые необходимо решать, т.е. от целевого назначения анализа.

Очевидно, что первоочередное назначение фармакопейных методов анализа – контроль качества готовой продукции. ЛАЛ-тест используется и для решения задач обеспечения качества производства, что включает входной контроль сырья, субстанций, полупродуктов, контроль технологических процессов, в том числе и на соответствие установленным для этих процессов уровням «тревоги» и «действия» и т.д.

В случае контроля качества готового лекарственного средства основным требованием, предъявляемым к методу контроля, является получение достоверного результата о соответствии ЛС установленным нормам качества. При этом не важно, качественный это результат или количественный. Такой результат может быть получен с помощью любого из рассмотренных методов проведения анализа. Поэтому в большинстве случаев возможностей гель-тромб теста оказывается вполне достаточно для проведения контрольных анализов.

При решении круга вопросов, относящихся к обеспечению качества производства ЛС, предпочтительнее использовать количественные результаты. Получить такие результаты можно и с помощью гель-тромб теста, но все же его возможности по точному определению концентрации эндотоксинов весьма ограничены. Точное определение содержания

эндотоксинов на разных стадиях производства позволяет перейти в буквальном смысле к прогнозированию качества. Так, если известна концентрация эндотоксинов в субстанции и в воде, используемых для приготовления лекарственного препарата, если процедуры обработки оборудования и технологические процессы валидированы и контролируются в реальном времени, можно с большой степенью уверенности определить, какова будет концентрация эндотоксинов в готовой форме.

Из сказанного можно было бы сделать вывод, что для контрольных лабораторий основным методом является гель-тромб тест. А при производстве лекарственных средств более целесообразно использование инструментальных анализов. Это в принципе верно, но при большом количестве анализов, вне зависимости от их назначения, неизбежно встанет вопрос о переходе к инструментальным методам анализа. Если же анализы проводятся редко, то наиболее рациональным решением будет, конечно, гель-тромб тест.

Следует признать, что инструментальные методы представляют собой комплексное и универсальное решение по сравнению с гель-тромб тестом. Исключительно полезными оказываются и прикладные компьютерные программы, предназначенные для проведения анализа и обработки результатов. Они позволяют хранить, обрабатывать и сравнивать между собой данные анализов, проведенных в разное время. Еще одно достоинство инструментальных методов заключается в том, что в них легко идентифицируются ошибки, связанные с «человеческим фактором», т.е. ошибки аналитика, допущенные на стадиях подготовки к опыту. Переход на эти методы наиболее рационален для крупных производств и крупных контрольных лабораторий, для лабораторий, проверяющих большое количество импортных препаратов, в НД которых часто включены кинетические методы контроля содержания эндотоксинов. В этой связи надо упомянуть, что есть целые группы препаратов, которые проверяются исключительно инструментальными методами, например, практически все инсулины проверяются хромогенным кинетическим методом.

К достоинствам гель-тромб теста можно отнести то, что он относительно прост в освоении, для его проведения требуется минимум пространства и оборудования. Это лучший вариант для лабораторий, которые проводят один - два анализа в неделю. В тоже время, гель-тромб тест дает возможность проверять препараты, образующие суспензии, или препараты, окраска которых не позволяет проводить фотометрические анализы.

Мы понимаем, что обзор методов получился далеко не полным. Действительно, об особенностях каждого метода можно написать не меньше, чем о свойствах гель-тромб теста. Понятно, что впереди еще много работы. Многие предстоит понять и освоить. Тем более, что на подходе уже совершенно новые варианты проведения ЛАЛ-теста, новые реактивы и оборудование.

Литература

Литература.

Bacterial endotoxins, 2.6.14., European Pharmacopoeia, III Ed., Strasbourg France. Supp. 2001.

The United States Pharmacopoeia, 24-th Ed. Suppl. 2. 2000.

"Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". // U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

"Interim guideline for human and veterinary drug products and biologicals: Kinetic LAL techniques". // Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1991.

Dawson M.E. A wealth of options. Choosing an LAL test method. LALUpdate. 1995., V. 13., No. 3.

Novitsky T.J. Diazo-coupling option with Pyrochrome chromogenic LAL. LALUpdate. 1998., Vol. 16., No. 2.

Tsuji K., Martin P. A., Bussey D. M. Automation of chromogenic substrate Limulus amoebocyte lysate assay method for endotoxin by robotic system Appl. Environ. Microbiol. 1984, Vol. 48. No. 3 p. 550-555

Novitsky T.J. Choosing a method. LAL Update, 1983, Vol. 1., No. 1

Lindsay G.K., Roslansky P.F., Novitsky T.J. Single-step, chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin. J. Clin. Microbiol. 1989. Vol. 27., No. 5., P. 947-951.

Cooper J.F., Polk C.S. Monitoring water systems for endotoxin. LALTimes 1998., Vol. 5, No. 2.

Cooper J.F., Jordan F.T. KTA2 formula approved for Endosafe. LALTimes 1997., Vol. 4, No. 3.

Dawson M.E. Interference with the LAL test and how to address it. LALUpdate. 2005., V. 22., No. 3.

Iwanaga S., Morita T., Nakamura T., Hiranaga M., Ohtsubo S. The Limulus coagulation system sensitive to bacterial endotoxins. In: Bacterial endotoxin. Chemical, Biological and Clinical Aspects. Homma J.Y., Luderitz O., Westphal (eds). Verlag Chemie Heidelberg 1984. P. 365-392.

Kawasaki H., Nose T., Muta T., et. al. Head-to-Tail Polymerization of Coagulin, a Clottable Protein of the Horseshoe Crab. J. Biol. Chem. 2000., Vol. 275, No. 45, pp. 35297-35301.

Novitsky T.J. Discovery to commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus. 1984. Vol. 27, N. 1, P. 13-18

Общая сопоставительная характеристика трех основных методов проведения анализа.

	Гель-тромб тест, Методы А и В	Кинетический турбидиметрический тест, Метод С	Кинетический хромогенный тест, Метод D
<i>Результаты</i>	Качественные /количественные	Количественные	Количественные
<i>Точность определения</i>	50-200%	+/- 25(50)%	+/- 25(50)%
<i>Расходные материалы</i>	Пробирки	Микропланшеты или пробирки	Микропланшеты
<i>Максимальное количество образцов в одном анализе</i>	Ограничено размерами бани или термоблока, обычно не более 3-4 образцов	Ограничено размерами микропланшета, до 20 образцов	Ограничено размерами микропланшета, до 20 образцов
<i>Чувствительность</i>	0,015-0,25 ЕЭ/мл	0,001-100 ЕЭ/мл	0,005-50 ЕЭ/мл
<i>Время анализа</i>	60 мин	30- 60 мин	30 - 60 мин
<i>Специализированное оборудование/длина волны</i>	Нет	Ридер для микропланшет или для пробирок / 340 нм	Ридер для микропланшет / 405 нм
<i>Программное обеспечение</i>	Нет	Да	Да

ОФС «БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ»

Материалы Семинара «Проведение контрольных анализов в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины»

Общая фармакопейная статья «Бактериальные эндотоксины» регламентирует правила проведения контрольных анализов и содержит требования, при выполнении которых контрольный анализ может считаться достоверным (валидированным). Структурно статья разделена на несколько частей. Ниже приводятся общие характеристики разделов ОФС.

Введение. Приводится общая характеристика метода, природа анализа, варианты проведения анализа, определение арбитражного анализа – Качественный гель-тромб тест. В заключении введения указывается, что могут быть использованы разные модификации гель-тромб теста и другие методы проведения анализа. При этом любая модификация или другой метод должны быть валидированы. Этот абзац в частности разрешает использование инструментальных методов проведения анализа, которые не описаны в статье.

Стандарты эндотоксина. Основным, эталонным стандартом является Международный стандарт эндотоксина. Содержание бактериальных эндотоксинов выражается в Единицах Эндотоксина (ЕЭ). Для рутинных анализов разрешено использование Контрольных стандартов эндотоксина (КСЭ). Активность его должна быть определена путем прямого сравнения с Международным стандартом с помощью используемой партии ЛАЛ-реактива. Это означает необходимость использования конкретной пары реактивов, поставляемых одним производителем.

ЛАЛ-реактив. Для проведения анализа должен быть использован ЛАЛ-реактив, предназначенный специально для проведения фармакопейных анализов. Вводится понятие чувствительности ЛАЛ-реактива и способы ее обозначения.

Вода для ЛАЛ-теста, реактивы для доведения рН, подготовка посуды. Для вспомогательных компонентов реакции кратко сформулированы требования, соблюдение которых может расширить свободу выбора. Это касается воды для ЛАЛ-теста, растворов для доведения рН, посуды. Они не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах, что примерно соответствует термину «апирогенны», который не применим в данном контексте. Буферные растворы и посуда не должны оказывать влияния на проведение реакции. Буферные растворы теоретически могут содержать компоненты, усиливающие или ингибирующие реакцию, а некоторые виды пластиковой посуды могут сильно адсорбировать эндотоксин, что можно квалифицировать как ингибирование реакции. Способы проверки качества отдельных компонентов специально не описаны. Такая проверка «встроена» в правила проведения двух предварительных анализов. В разделе «Посуда и ее подготовка» разрешенный режим депириогенизации – обработка при 250°C не менее 30 минут.

Процедура анализа. В разделе регламентированы общие правила проведения инкубирования и оценки результатов анализа. Это стандартные правила проведения гель-тромб теста, которым необходимо следовать и при проверке ЛАЛ-реактива, и при контроле испытуемого препарата. Любое изменение указанных в ОФС правил проведения анализа должно считаться модификацией основного метода. Такие модификации анализа должны быть валидированы с помощью основного метода.

Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива. Этот анализ считается предварительным. Его традиционное название не в полной мере отражает его назначение. Проверяется не только качество ЛАЛ-реактива, но и стандарт эндотоксина, вода для ЛАЛ-теста, посуда, устройство для инкубирования и т.п. Другими словами, проверяется вся тест-система. Более того, можно считать, что одновременно проверяется и квалификация персонала. Для проведения анализа готовится серия разведений КСЭ, каждое следующее разведение должно быть вдвое меньше предыдущего. Используются следующие концентрации КСЭ: 2λ; λ; 0,5λ; 0,25λ. Анализ проводится в четырехкратной повторности.

Анализ Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива по ОФС

Схема анализа Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива.

Растворы	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе	Количество повторностей
А	Раствор КСЭ в Воды для ЛАЛ-теста с концентрацией КСЭ - 2λ	Вода для ЛАЛ-теста	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
В	Вода для ЛАЛ-теста	-	-	-	2

Условием достоверности результатов являются адекватные результаты в отрицательном контроле. Для концентрации эндотоксина, равной 0,25λ результат тоже должен быть отрицательным. Это второе условие объясняется правилом оценки результатов для каждой из повторностей. За результат реакции принимается наименьшая концентрация, в которой получен плотный гель. Следовательно, должна быть еще как минимум одна, меньшая концентрация эндотоксина, в которой гель не образуется. Так как разведения КСЭ представляют собой геометрический ряд, рассчитывается среднее геометрическое значение чувствительности по результатам для всех четырех повторностей. Это среднее значение должно быть не менее 0,5λ и не более 2λ, т.е. должно укладываться в допустимую для всего теста двукратную погрешность.

Если полученное значение соответствует указанным требованиям, можно считать, что проверка прошла успешно, и все проверяемые компоненты могут быть использованы в последующих анализах. Необходимо понимать, что этот анализ представляет собой проверку, а не определение и не уточнение чувствительности ЛАЛ-реактива, и, следовательно, его результаты являются справочными. Во всех следующих расчетах используется именно заявленная чувствительность, а не определенное в тесте значение.

В протоколах всех последующих анализов целесообразно делать ссылку на дату и номер опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива».

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» необходимо повторить, если изменяется какая-либо из составляющих тест-системы.

Максимально допустимое разведение испытуемого препарата. Вводится понятие Максимально допустимого разведения испытуемого препарата (МДР). Приведены правила расчета МДР, и указывается, что фармакопейный анализ (качественный и количественный) не должен проводиться в разведениях, больших МДР.

Мешающие факторы. Испытуемый препарат может оказывать влияние на реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами. Он может вызвать гелирование ЛАЛ-реактива в отсутствие эндотоксинов или наоборот ингибировать реакцию. Для доказательства обратного достаточно воспроизвести схему опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», используя испытуемый препарат в качестве растворителя для КСЭ. Если испытуемый препарат не оказывает влияния на ход реакции, то чувствительность ЛАЛ-реактива будет соответствовать заявленному значению. В разделе кратко упоминаются способы преодоления ингибирования. Анализ «Мешающие факторы» так же, как и «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», является предварительным анализом. Этот анализ проводится в рамках валидации метода для конкретного лекарственного препарата.

Подготовка проб. В разделе приведены общие правила подготовки испытуемого препарата. Важным моментом является указание на то, что анализ должен проводиться индивидуально для каждого из отобранных образцов проверяемой серии испытуемого препарата. Это не означает запрета проверки объединенной пробы, однако такой анализ может быть проведен только после пересчета значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов для объединенной выборки.

Качественный анализ. Качественный анализ является простейшим способом проверки испытуемого препарата. В тесте препарат исследуется в одном разведении. Если результаты для этого разведения окажутся отрицательными, препарат считается прошедшим тест. Степень

разведения должна соответствовать той, при которой был проведен анализ «Мешающие факторы». С точки зрения надежности проверки лучше исследовать препарат в разведении, меньшем МДР.

Качественный анализ по ОФС

Раствор	Исходный раствор	Конечная концентрация эндотоксина (КСЭ) в испытуемом растворе	Количество повторностей.
<i>A</i>	Испытуемый препарат	-	2
<i>B</i>	Испытуемый препарат, содержащий КСЭ в концентрации 2λ	2λ	2
<i>C</i>	Раствор КСЭ в Водe для ЛАЛ-теста с концентрацией КСЭ - 2λ	2λ	2
<i>D</i>	Вода для ЛАЛ-теста	-	2

Для проверки достоверности результатов ставятся три контроля.

- Отрицательный контроль (вода для ЛАЛ-теста), в котором проверяется чистота реактивов и посуды в условиях данного опыта.
- Положительный контроль (КСЭ в концентрации 2λ). В редуцированном виде это подтверждение чувствительности ЛАЛ-реактива в условиях опыта.
- Положительный контроль испытуемого препарата (раствор испытуемого препарата, к которому добавлен КСЭ в концентрации 2λ).

Дополнительное условие, гарантирующее безопасность результатов, заключается в том, что в разведении, равном МДР, реакция должна быть обязательно отрицательной. Так как концентрация эндотоксинов должна быть **не больше** предельно допустимой, безопасной можно считать только концентрацию эндотоксинов **меньше** предельно допустимой. Это возможно только в том случае, если для разведения, равного МДР, результат будет отрицательным.

Всего в анализе используется 8 пробирок. Контроли отрицательный и положительный могут быть общими для нескольких испытуемых образцов, инкубируемых одновременно. Анализ, оформленный в виде обычного табличного представления результатов опыта, выглядит очень просто:

Запись результатов Качественного теста

<i>Повторности</i>	<i>П</i>	<i>П+</i>	<i>К</i>	<i>К+</i>
1	-	+	-	+
2	-	+	-	+

П - Испытуемый препарат

П+ - Положительный контроль испытуемого препарата

К- - Контроль отрицательный

К+ - Контроль положительный

Результаты записываются для каждой повторности как положительные или отрицательные (+ или -). Если в контролях получены адекватные результаты, и для испытуемого препарата результат реакции отрицательный, препарат соответствует требованиям НД.

Повторный анализ. В том случае, когда результаты анализа указывают на возможное превышение содержания эндотоксина по сравнению с установленной нормой, проводится

повторный анализ. При этом надо понимать, что подразумевается под этим термином, и какие результаты не попадают под определение «повторный анализ».

Если в одном или нескольких контролях получен неверный результат, такой анализ не означает выбраковки препарата, хотя и не позволяет принять решение о разрешении на использование препарата. В таком случае необходимо понять причину ошибки и повторить анализ. Этот анализ не может считаться повторным.

Если получены положительные результаты для препарата в разведении, меньшем МДР, анализ может быть повторен в максимально допустимом разведении. Такой анализ тоже не может считаться повторным анализом.

Повторным анализом может считаться анализ, который проводится в случае получения результатов, которые могут свидетельствовать о возможном превышении допустимого содержания эндотоксина в разведении, равном МДР. Как правило, это относится к «промежуточным» результатам – одна повторность для разведения испытуемого препарата положительная, другая – отрицательная. В этом случае анализ может быть повторен один раз, именно этот анализ и называется повторным.

Количественный анализ. Цель анализа – определение содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате. Точность этого определения не очень высока, ошибка может составлять 50-200%, но это свойство гель-трома теста вне зависимости от способа его проведения. Определение концентрации проводится с помощью серии последовательных двукратных разведений испытуемого препарата. Наибольшее разведение не должно превышать значения МДР.

Количественный анализ по ОФС

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе	Количество повторностей
А	Испытуемый препарат	Вода для ЛАЛ-теста	1	-	2
			2	-	2
			4	-	2
			8	-	2
			и т.д. до МДР		
В	Испытуемый препарат, содержащий КСЭ в концентрации 2л	Испытуемый препарат	1	2л	2
С	Раствор КСЭ в Воды для ЛАЛ-теста с концентрацией КСЭ - 2л	Вода для ЛАЛ-теста	1	2л	2
			2	1л	2
			4	0,5л	2
			8	0,25л	2
Д	Вода для ЛАЛ-теста	-	-	-	2

Достоверность анализа подтверждается тремя контролями. В качестве положительного контроля в этом тесте используется такой же ряд концентраций КСЭ, как в тесте по проверке чувствительности ЛАЛ-реактива. Такой контроль необходим для подтверждения точности полученных результатов. Положительный контроль испытуемого препарата ставится только для минимального его разведения. Такое испытание наиболее концентрированного препарата оправданно, так как в случае отсутствия ингибирования в этом разведении можно быть уверенным в том, что и во всех последующих разведениях этого ингибирования не будет. Отрицательный контроль проводится так же, как и для «Качественного теста».

По результатам, полученным для серии разведений испытуемого препарата можно рассчитать концентрацию бактериальных эндотоксинов. За результат реакции (конечную точку) принимается наибольшее разведение, при котором еще происходит образование геля в каждой из повторностей. По результатам, полученным для обеих повторностей, рассчитывается среднее геометрическое значение содержания бактериальных эндотоксинов.

Следует обратить внимание на некоторые особенности, связанные с проведением количественного анализа по ОФС «Бактериальные эндотоксины»:

Разведения всегда должны быть двукратными. Нельзя получить большей точности определения концентрации бактериальных эндотоксинов, изменяя коэффициент разведения (разведения с шагом 1,2 или 1,5 и т.д.). Точность определения от этого не увеличится. Противоречит

правилам проведения анализа и постановка разведений испытуемого препарата с шагом больше, чем 1:2, например 1:10. Такие разведения могут быть использованы при проведении предварительных испытаний. При подготовке серии разведений испытуемого препарата нельзя превышать значения максимально допустимого разведения. В МДР результаты должны быть обязательно отрицательными.

Новая редакция ОФС «Бактериальные эндотоксины». В связи с истечением срока действия ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины» (в декабре 2005 г) подготовлена новая редакция общей фармакопейной статьи. В целом, новую редакцию ОФС можно рассматривать как развитие действующей статьи. Основная терминология и схемы проведения всех анализов остались неизменными, поэтому принятие новой редакции статьи не вызовет необходимости пересмотра большого массива ФСП, принятых в период действия ОФС 42-0002-00.

К числу принципиальных изменений можно отнести введение правил расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов, приведенных в разделе «Максимально допустимое разведение испытуемого препарата». Указаны пороговая пирогенная доза и формула для расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, предназначенных для парентерального введения, вводимых интратекально и для радиофармацевтических препаратов.

Анализ «Бактериальные эндотоксины» в отечественной нормативной документации

Ситников А.Г., Долгова Г.В., Неугодова Н.П.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №1 (20) 2008

Более десяти лет назад, в сентябре 1997 года Государственный Фармакопейный комитет утвердил Временную Фармакопейную Статью (ВФС 42-2960-97) «Определение содержания бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест)». Это был первый отечественный документ, регламентирующий правила проведения анализа. С этой статьи и началась история официального использования ЛАЛ-теста в России. Десять лет - это достаточно долгий временной интервал. Он позволяет не только подвести итоги, но и увидеть тенденции и закономерности, которые дают возможность заглянуть в будущее. В этой статье мы бы хотели коснуться и того, и другого - итогов и возможных перспектив. Но, наверное, правильнее всего было бы начать с истории утверждения первой статьи «Бактериальные эндотоксины».

ВФС 42-2960-97 «Определение содержания бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест)».

Первоначальная версия проекта статьи была подготовлена в начале 90^х годов. Этот проект прошел несколько циклов обсуждений в Фармакопейном Комитете, по ходу которых в него вносились дополнения и исправления. Однако, в то время дальше обсуждений дело не зашло, и проект статьи был отложен на неопределенное время.

Что представлял собой этот проект? Безусловно, на него оказали влияние действующие тогда зарубежные Фармакопейные статьи, описывающие

правила проведения ЛАЛ-теста. В первую очередь, Фармакопея США 22 издания и Европейская Фармакопея 3 издания. Надо отметить, что в начале 90^х годов еще не было выработано консолидированного взгляда на то, каким должен быть «правильный» анализ. Тексты различных фармакопей различительно отличались друг от друга. Статья в Американской Фармакопее была очень подробной, но и исключительно сложной для понимания. В Европейской Фармакопее, напротив, изложение правил было очень доступным, и как сегодня понятно, слишком упрощенным. Проект ВФС вобрал в себя элементы обеих статей. По стилистике он в большей степени следовал в фарватере Европейской фармакопеи. Но много было в проекте и от Фармакопеи США. В частности, в качестве единицы эндотоксина была принята единица эндотоксина Фармакопеи США (EU), в нашей транскрипции ЕДэ, а в качестве основного стандарта эндотоксина упоминался Американский национальный стандарт (Reference Standard Endotoxin, RSE). Последнее обстоятельство объяснялось тем, что все основные реактивы производились в США, там же было сформулировано понятие «пороговой пирогенной дозы», крепко привязанное к национальному стандарту эндотоксина США. Однако, именно со стандартом эндотоксина возникло больше всего трудностей. Согласно отечественным требованиям, контрольный стандарт эндотоксина (PCO - рабочий стандартный образец) должен быть откалиброван по стандарту отечественной Фармакопеи, которого естественно не было. Сложилась тупиковая ситуация, весьма показательная для того времени. В стране еще действовали принятые ранее нормы и правила, в то время как собственное производство стандартов уже не работало.

К слову сказать, попытки создать собственный стандарт эндотоксина все же были. Во всяком случае, такая возможность обсуждалась, и эта гипотетическая

перспектива оказала свое влияние на судьбу проекта ВФС. Одной из причин, по которой было отложено принятие статьи, оказалось ожидание появления отечественного стандарта эндотоксина. Хотя, видимо, главной причиной того, почему в начале 90^х годов эта статья не была принята, было экономическое состояние страны. В тех условиях, в которых оказалось отечественное фармацевтическое производство в то время, было просто не до ЛАЛ-теста.

Вторая жизнь проекта ВФС началась в 1995-96 годах, когда в стране начал активно формироваться рынок лекарственных средств. Значительную часть этого рынка составляли импортные препараты, среди которых было много инъекционных. Нормативная документация на эти препараты часто представляла собой пеструю смесь из фрагментов разных фармакопей, внутривзаводских регламентов и импровизаций переводчиков. Иногда попадались совершенные перлы, например: «... используется ЛАЛ-реагент, который представляет собой препарат, приготовленный из соскоба лошадиного копыта...» или «... при проверке лекарственного препарата может происходить энхансмент* реакции...». (* «энхансмент» это то, что раньше называлось «варваризмом», слово не переводится, а приводится в транскрипции, *enhancement* (англ.) - усиление).

Было совершенно очевидно, что необходим свой отечественный нормативный документ, регламентирующий правила проведения анализа. Вот тут и пригодился ранее подготовленный проект статьи. Примерно в течение года проект прошел цикл повторных обсуждений, при этом он оброс уточнениями и примечаниями, кстати, не всегда удачными. И в середине сентября 1997 этот проект был благополучно утвержден в качестве Временной Фармакопейной Статьи.

Интересно то, что после утверждения ВФС зарубежные компании очень неохотно соглашались на проведение анализа своих препаратов по требованиям отечественной Фармакопеи. Впрочем, это объяснимо: в то время было много разных трактовок правил проведения анализа, что могло поставить под сомнение сходимость результатов. Поэтому иностранные компании без особой радости соглашались на проведение анализа по чужим правилам. Получилось, что первичная цель официального принятия ВФС достигнута была только частично. Но дело было сделано. Главным, конечно, стало то, что статья открыла возможность нашим предприятиям вводить в свои ФСП метод анализа, альтернативный анализу «Пирогенность». И очень медленно, но неуклонно метод стал завоевывать популярность. В 1997 году был проведен первый семинар по правилам

постановки анализов в соответствии с фармакопейными требованиями.

Примечательно, что годом позже после принятия ВФС появился документ макроуровня - ОСТ 42-510-98 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP)». Необходимость и неизбежность перехода на GMP заставила производителей пересмотреть многие старые взгляды и стереотипы. И тут ЛАЛ-тест оказался очень кстати, поскольку этот анализ позволяет не только контролировать качество готового лекарственного средства, но и помогает эффективно контролировать процессы производства, позволяя получать препарат с предсказуемыми характеристиками (в части содержания бактериальных эндотоксинов). Собственно именно в управлении качеством и заложена главная идея «правильной производственной практики». Кстати сказать, и в США, где ЛАЛ-тест используется давно и очень широко, считается, что наибольшую часть всех проводимых анализов составляют не контрольные опыты, а внутрипроизводственный контроль качества сырья, полупродуктов и пр.

Срок действия ВФС был ограничен тремя годами. Можно сказать, что за отпущенное ей время ВФС «Определение содержания бактериальных эндотоксинов. ЛАЛ-тест» отработала по максимуму. Несмотря на ее очевидную слабость, на ошибки, несмотря на некоторое упрощенчество, она дала возможность просто начать работать. И этого было уже достаточно.

ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины».

Пересмотр Временной Фармакопейной Статьи происходил уже не на пустом месте. За три года развития метода было накоплено достаточно опыта и статистики. Было изжито много страхов и опасений. Метод вышел из детского возраста. Настало время серьезной, профессиональной работы. Для этой работы и создавался новый инструмент - общая фармакопейная статья, которая после ее утверждения стала хорошо известной сегодня ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины».

Статья оказалась действительно новой, полностью переработанной, более подробной и значительно большей по объему. Поблажки и уступки, которые были в первой редакции, исчезли. В то же время очень много вобрала в себя новая статья и из ВФС.

Очень важным обстоятельством оказалось и то, что плановый пересмотр статьи осуществлялся в тот момент, когда происходил процесс гармонизации требований основных зарубежных статей. В этой гармонизации были заинтересованы все, и особенно, крупные транснациональные компании-производители лекарственных

средств. Гармонизация или унификация требований позволяет работать по одним и тем же методикам и гарантирует хорошую сходимость результатов, полученных в разных лабораториях. Проект новой редакции был опубликован в иностранной литературе и широко обсуждался. Гармонизированная статья «Бактериальные эндотоксины» была утверждена в 2000 году одновременно Фармакопеями США, Японии, Европейской фармакопеей. Ее обычно так и называют «Гармонизированная статья ВЕТ (Bacterial Endotoxin Test)», уже без ссылок на национальные фармакопеи.

Основные положения и идеология гармонизированной статьи «Бактериальные эндотоксины» нашли отражение и в проекте ОФС. Пожалуй, единственным принципиальным отличием ОФС от ее зарубежных аналогов явилось отсутствие описания фотометрических анализов. Это отличие не было вызвано никакими особыми идеологическими соображениями, просто в тот момент никто у нас в стране еще не задумывался о широкомасштабном использовании этих методов.

ОФС 42-0062-07 «Бактериальные эндотоксины».

ОФС 42-0002-00 безусловно явилась новой вехой в истории ЛАЛ-теста в нашей стране. В период с 2000 года по данным ИСКЛС значительно возросло число инъекционных препаратов, которые соответственно требованиям нормативных документов, должны подвергаться контролю по показателю «Бактериальные эндотоксины».



И хотя срок действия общей статьи больше чем временной, но и он ограничен. В 2005 году возникла потребность в пересмотре статьи. Эта необходимость оказалась хорошим поводом для внесения изменений и уточнений в текст действующей статьи.

Новый проект статьи был подготовлен к концу 2005 года, и после цикла обсуждений он был утвержден Государственным

Фармакопейным комитетом. В этот раз изменения оказались не столь серьезными и комплексными, какими они были в первый раз. Пожалуй, наиболее заметным дополнением к тексту статьи стало расширение раздела «Максимально допустимое разведение испытуемого лекарственного средства», в который были введены правила расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов. Введение этих дополнений представлялось очень важным, поскольку в отечественной нормативной документации совершенно не оговаривались правила расчета нормы бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах. Ситуация сложилась довольно нелепая: более десяти лет фармацевтическая промышленность использует метод, его включают в ФСП, нормы содержания эндотоксинов обсуждаются и утверждаются в Фармакопейном комитете, и при этом нигде не оговаривается, по каким правилам эта норма должна быть рассчитана. Поэтому в новой редакции ОФС и появился новый раздел. В нем приводится понятие «Пороговой пирогенной дозы», зависящей от способа введения лекарственного препарата. Также приведена формула, по которой следует рассчитывать значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для лекарственного средства.

Некоторые изменения претерпела и общая структура статьи. Так, в статье появился новый раздел «Предварительные анализы», к которым отнесены анализы «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» и «Мешающие факторы». Эти анализы играют роль основных валидационных экспериментов, без которых невозможно проведение рутинных опытов. Поэтому целесообразно было объединить оба эти анализа в одну группу, тем самым, подчеркнув их место и значение.

Остальные правки можно назвать редакционными. Например, более подробно и системно были описаны условия, определяющие достоверность результатов и правила интерпретации этих результатов.

Терминология, принятая в предыдущей версии осталась практически без изменений. Основные определения и названия уже можно считать устоявшимися и привычными. Эти термины используются в ФСП, СОПах и т.д., поэтому вносить какие-то изменения имеет смысл только в случае действительной необходимости.

Конечно, новая редакция заслуживает более подробного рассмотрения, и в одном из следующих номеров мы обязательно вернемся к этой новой версии статьи «Бактериальные эндотоксины».

Перспективы развития ОФС.

Если говорить о перспективах дальнейшего развития фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины», то кардинальное направление понятно сразу. Это совершенствование статьи в части правил проведения фотометрических анализов. Необходимость внесения этих дополнений со временем становится все актуальнее. Массовое использование метода на крупных производствах рано или поздно приведет к пониманию целесообразности перехода с гель-тромб теста на кинетические анализы, которые гораздо легче автоматизировать. Очевидно, что рано или поздно в общей статье должны появиться разделы, описывающие правила проведения фотометрических анализов. Эти изменения должны ликвидировать информационный разрыв, существующий в настоящее время между отечественной статьей и Гармонизированной статьей ВЕТ.

В процессе подготовки этих изменений придется дать ответ на один весьма принципиальный вопрос - какой путь следует выбрать? Можно продолжать совершенствовать собственную фармакопейную статью, можно поступить иначе и подготовить перевод статьи, например из Европейской Фармакопеи. Вообще говоря, этот вопрос впервые встал еще в 2000 году, когда готовились изменения к ВФС. С одной стороны, идея прямого перевода Европейской фармакопеи выглядит не так уж и плохо. Но есть некоторые вопросы, которые ставят под сомнение целесообразность такого подхода.

Во-первых, если уж переводить, то не одну статью, а всю Фармакопею. Этот путь был выбран нашими коллегами на Украине. Надо отдать им должное: начав это поистине глобальное мероприятие, они действуют последовательно и методично. К настоящему времени в ГФУ (Государственная Фармакопея Украины) собрана уже значительная часть переведенных статей из Европейской Фармакопеи. Причем выбран очень интересный подход, позволяющий сочетать требования Европейской Фармакопеи с национальными требованиями. Общая или частная статья может состоять из двух блоков. Первый - это собственно перевод. Надо отметить, что перевод очень точный и профессиональный. Вторая часть присутствует в том случае, если имеют место национальные требования, дополняющие или отличные от требований Европейской Фармакопеи.

Еще раз хочется отметить, что это очень целостный и последовательный подход. Пожалуй, единственным его недостатком является то, что подготовка перевода, его обсуждение и печать обновленной редакции может запаздывать за изменениями, произошедшими в основном источнике.

Другой подход - создание собственной Фармакопеи, в нашем случае, естественно, речь идет только о собственной фармакопейной статье. В этом случае сохраняется определенная независимость текста, к тому же редактирование или изменение статьи может проводиться по мере необходимости и без оглядки на иностранные источники. Главное в этой ситуации не перегнуть палку и не начинать изобретать собственный велосипед. Вообще же задача создания собственной статьи достаточно сложна, поскольку она предполагает хорошее понимание особенностей самого метода, общих правил проведения анализа, а также знание отечественных правил, регулирующих производство и обращение лекарственных средств.

Пока у нас выбран второй подход. Конечно, дело тут не в желании проявить какую-то особенную самостоятельность. Просто необходимо учитывать отечественную специфику. Поэтому списывание одной отдельной фармакопейной статьи ни в коем случае не приблизит нас к чужим стандартам.

Вообще же представляется, что главная задача заключается, наверное, не в стремлении к аутентичности текстов, тем более, что при переводе неизбежно теряется часть заложенных в исходном документе смыслов. Важнее добиться идентичности в основном - правилах постановки анализов, правилах интерпретации результатов и единой системе выражения этих результатов. В этом смысле, начиная с ОФС 42-0002-00 можно говорить о значительной схожести (смысловой идентичности) с текстом Гармонизированной статьи. Повторим, что на сегодня единственной серьезной «купюрой» из текста Европейской Фармакопеи является исключение правил проведения фотометрических анализов.

Нельзя не сказать также, что, хотя статьи в трех Фармакопеях (USP, EP, PJ) считаются гармонизированными, и более того, все три написаны на одном языке, эти статьи все же в некоторых деталях отличаются друг от друга. Отличия не очень значительные, но тем не менее они есть. Эти отличия могут затрагивать терминологию, например, в USP используются термины «ЛАЛ-реактив» и «вода для ЛАЛ-реактива», а в EP тоже самое называется «лизат» и «вода для ВЕТ». В Японской фармакопее, в отличие от Европы и США, при расчете предельного содержания бактериальных эндотоксинов за среднюю массу тела принимают 60 кг, а не 70 кг. Даже само название общих статей оказалось разным. В USP - «Bacterial Endotoxin Test», ВЕТ, в EP - «Bacterial Endotoxins». При этом общепринятым является сокращенная аббревиатура ВЕТ. Все это лишний раз говорит о том, что гармонизированные тексты совсем не обязательно должны быть абсолютно идентичными.

Представляется, что эволюция нашей статьи должна идти в рамках общей тенденции гармонизации, при этом совсем не обязательно делать перевод чужого текста. Важнее добиться полного идеологического и методологического совпадения фармакопейных требований. Кстати говоря, далеко не каждый перевод может быть квалифицирован таким образом. В этом смысле, видимо, надо говорить не о гармонизации, а о конвергенции, т.е. о схождении признаков.

Нормативная документация по валидации метода.

Вопрос формирования отечественных нормативных требований по валидации метода медленно переходит в категорию вечных. Несколько лет назад была предпринята попытка решения этого вопроса путем создания методических рекомендаций по валидации ЛАЛ-теста. Черновая редакция проекта таких методических рекомендаций была подготовлена и даже прошла первичное обсуждение. Дальше дело не пошло по ряду причин, в том числе еще и потому, что не вполне понятно, на каком уровне должен утверждаться этот документ, и каким будет его официальный статус.

В зарубежной практике есть два прецедента создания таких документов. Это Руководство FDA по валидации метода и комментарии по валидации, приведенные в качестве послесловия к статье в Европейской Фармакопее. Документы эти, хотя они и предназначены для решения одних и тех же задач, очень различны и по форме, и по содержанию. Для сравнения: рекомендации FDA по валидации с примерами и приложениями - это 53 страницы убористого текста, а рекомендации по валидации в Европейской Фармакопее - всего 4 страницы общих рассуждений. По форме рекомендации FDA носят в большей степени директивный статус. Рекомендации в Европейской Фармакопее - это скорее набор общих пожеланий.

Официальный статус рекомендаций FDA и EP.

В США статус Рекомендаций FDA был достаточно высок. Достаточно сказать, что этот документ включал не только рекомендации по валидации, но и текст фармакопейной статьи в качестве одного из приложений. Документ этот был предметом активного обсуждения, в котором принимали участие и государственные органы, и производители лекарственных средств. Окончательная редакция была утверждена только в 1987 году. До сегодняшнего дня этот документ является наиболее важным и часто цитируемым. Несмотря на то, что он представляет собой всего лишь национальные требования FDA, его положения стали стандартом де-факто практически во всех странах. Считается, что после публикации

Гармонизированной статьи этот документ потерял свое первоначальное значение и как бы перестал быть официальной нормой, но он до сих пор является основным нормативом, на который ссылаются при валидации метода для лекарственного препарата.

По другому пути пошла Европейская Фармакопея, включив рекомендации по валидации в текст статьи и назвав их необязательной (рекомендательной) частью Фармакопеи. Решение очень неплохое, в том числе и потому, что статья и рекомендации имеют одинаковый юридический статус и в равной степени регулируют правила проведения анализа. Они же могут одновременно обновляться, если возникает такая необходимость. Теоретически это очень неплохая структурная связка двух документов. Реализация же идеи оказалась не столь удачной, как сама идея. Во многом, конечно, это объясняется тем, что ЛАЛ-тест достаточно сложный анализ, и охватить все вопросы в тексте, ограниченном по объему и форме, не представляется возможным.

Содержание и структура рекомендаций FDA и EP.

Руководство FDA по валидации было утверждено в 1987 году. Как уже отмечалось выше, это очень объемный документ, который включает в себя правила валидации метода для лекарственных препаратов, ветеринарных препаратов и изделий медицинского назначения.

В основной части Рекомендаций описаны правила валидации ЛАЛ-теста для лекарственных средств и изделий медицинского применения для разных методов проведения анализа. Правила эти сформулированы очень конкретно, есть подробности, которых нельзя встретить нигде больше. Например, указывается, какое количество образцов из серии следует использовать в опытах, и на каком количестве серий следует проводить валидацию, а так же в каких случаях и каким образом должна быть проведена ревалидация метода. Представляется очень важным и то, что в документе рассматриваются не только правила валидации для конкретного препарата, но и правила проведения первоначальной квалификации лаборатории и аттестации специалистов.

Кроме основной части, в которой описаны правила валидации, этот документ содержит еще и пять приложений, в которых рассматриваются правила работы с Национальным и Контрольными Стандартами эндотоксина, правила расчета значения предельного содержания эндотоксинов и МДР с примерами. Кроме того, в качестве приложения к этому документу включен обширный список инъекционных препаратов, для которых в USP предписан ЛАЛ-тест с указанием значений предельного содержания эндотоксинов для каждого препарата. К

сожалению, последнее обновление этого списка было сделано в 1991 году, и некоторые нормы с тех пор были пересмотрены. Но даже сегодня это приложение можно рассматривать как очень ценную справочную информацию.

Высокий статус документа подчеркивает и то, что в него в качестве приложения включена и общая фармакопейная статья BET USP XXI издания.

Таким образом, можно констатировать, что руководство FDA – это, возможно, наиболее удачный пример свода правил по валидации метода. Остается сожалеть лишь о том, что оно уже не переиздается и переиздаваться не будет, а также о том, что ему не был присвоен международный статус.

Рекомендации по валидации Европейской Фармакопеи оставляют странное впечатление. В них слишком много пространных рассуждений и очень мало конкретики. Только в отдельных частях этого документа приводятся четкие требования и формулировки, в качестве иллюстрации можно процитировать несколько пунктов из рекомендаций по замене анализа «пирогенность» на ЛАЛ-тест:

- *Частные статьи, предусматривающие проведение испытания, могут включать только одно испытание: или испытание на пирогены на кроликах, или испытание на бактериальные эндотоксины.*
- *При отсутствии доказательств обратного, испытание на бактериальные эндотоксины является предпочтительным перед испытанием на кроликах, поскольку считается, что испытание на бактериальные эндотоксины обеспечивает равную или большую безопасность для здоровья пациента...*

В документ также включены несколько примеров расчетов предельного содержания эндотоксинов и значения МДР. Указаны и значения пороговых пирогенных доз в зависимости от способа введения лекарственного средства. Коротко рассматриваются правила проведения валидации для разных методов анализа.

В целом же в документе очень много пожеланий и рекомендаций, вроде: «следует показать», «необходимо убедиться», «надо быть уверенным» и т.д. Но к сожалению эти пожелания повисают в воздухе, поскольку за ними не следуют четкие указания.

Как отмечалось выше, идея создать структурную связку - Общая статья - Рекомендации - заслуживает всяческих похвал. К недостаткам документа можно отнести некоторую пространность и аморфность формулировок. Также в некоторых разделах рекомендаций фактически повторяются описания и определения, приведенные в общей статье. Например, разделы, касающиеся воды для ЛАЛ-теста, посуды, ЛАЛ-реактива. Об этих повторах приходится только сожалеть,

поскольку они занимают лишнее место в и без того кратких рекомендациях.

Каким быть отечественным рекомендациям?

Как ни странно, но наиболее правильным решением опять кажется подготовка собственного нормативного документа, вобравшего в себя как требования FDA, так и EP. При этом по статусу данный документ должен быть уравнен с OFC, т.е. он должен быть по сути, аналогом приложения, сделанного для EP. По содержанию наибольший интерес представляют рекомендации FDA. Совершенно очевидно, что для отечественного пользователя основной интерес будут представлять конкретные рекомендации по правилам валидации анализа. Очень разумным кажется и структурирование валидационных процедур на общие (первичная квалификация лаборатории и аттестация сотрудников) и частные для конкретного лекарственного средства. Описание правил первичной квалификации лаборатории может быть полезно не только для непосредственных исполнителей, но и для организаций, проводящих лицензирование и инспектирование контрольных лабораторий.

Очень хотелось бы, чтобы будущий проект прошел как можно более широкое обсуждение. В этом обсуждении сегодня вполне могут принять участие десятки хорошо подготовленных специалистов, давно работающих с методом. Думается, что такое обсуждение будет и очень заинтересованным, поскольку предметом обсуждения будут правила, по которым далее придется работать всем.

Заключение.

Вопрос необходимости создания методических рекомендаций, как уже отмечалось выше, «перезрел», но, похоже, что в ближайшем будущем возможны и позитивные сдвиги. Если этот документ будет создаваться как часть OFC, то при его подготовке можно будет одновременно решить и другую задачу – внесение в OFC разделов, касающихся правил проведения фотометрических анализов.

Какими бы ни оказались наши отечественные рекомендации по валидации, нельзя не принимать во внимание и того, что любой официальный документ имеет, так сказать, имманентные недостатки, которые вытекают из его официального статуса. Этих недостатков несколько.

Во-первых, это ограниченный объем документа, в который физически невозможно вставить все возможные варианты решений.

Во-вторых, это официальный язык, который может быть директивным, может быть рекомендательным, но совершенно необязательно должен быть литературным и понятным. Характерный пример – текст OFC:

у человека, незнакомого с методом, первое прочтение статьи оставляет очень тяжелое впечатление.

В-третьих, даже у самых универсальных решений есть исключения, оговорки и пр. Поскольку метод сложный, а его валидация - процедура многогранная, то и исключений набирается достаточное количество. Охватить все в одном документе просто невозможно.

Из всего вышесказанного легко сделать вывод, что одних только рекомендаций будет недостаточно для создания полноценной основы для функционирования метода. В этой связи просматривается самоочевидное решение - кроме официальных документов нужна подготовка чего-то вроде практикума по валидации метода и правилам проведения рутинных анализов. Причем этот практикум может быть решен в виде книги с относительно свободной структурой, общий объем с объяснениями и примерами так же может быть произвольным.

Такой тандем Рекомендации - Практикум может быть очень удачным. В этой связке Рекомендациям будет отводиться роль директивы, основной смысл которой в утверждении того, что валидация необходима. В Практикуме же можно трактовать и развивать положения рекомендаций. В нем можно приводить необходимое количество примеров, обсуждать различные варианты решений, рассматривать исключения из правил и подробно разбирать технологию их решений.

Впрочем, не исключено, что со временем появятся и иные идеи и альтернативы. У нас за спиной пока всего немногим более десяти

лет эволюции метода. События и изменения, произошедшие за это время, позволяют смотреть в будущее с оптимизмом. Можно сказать, что мы только начинаем работать, и все самое интересное у нас впереди.

Литература.

ВФС 42-2960-97) «Определение содержания бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест)», Москва 1997 г.

ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины» Москва, 2000 г.

ОФС 42-0062-07 «Бактериальные эндотоксины». Москва 2007 г.

United States Pharmacopoeial Forum, 26(1) <85> Bacterial endotoxin test (The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville MD) 2000.

The United States Pharmacopoeia, 24-th Ed. Suppl. 2. 2000.

Pharmeuropa 1999, Vol. 11, No. 2.

Bacterial endotoxins, 2.6.14., European Pharmacopoeia, III Ed., Strasbourg France. Supp. 2001.

"Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". // U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ, ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате
Г.В.Долгова, Н.П.Неугодова, А. Г.Ситников

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №3(4) 2003

Пирогенный эффект, возникающий в организме человека и животных после инъекций растворов с примесями бактериальных эндотоксинов (БЭ), зависит от их общей дозы. Пороговой пирогенной дозой считается доза БЭ, равная 5 ЕЭ на 1 кг массы человека в час. Это значение впервые было принято Фармакопеей США и приведено в Руководстве по валидации ЛАЛ-теста, опубликованном в 1987 году [1]. В настоящее время это значение пороговой пирогенной дозы принято на международном уровне и приведено в Европейской Фармакопее, Британской Фармакопее и других фармакопеех мира, которые используют ЛАЛ-тест в контроле инъекционных препаратах.

Значение пороговой пирогенной дозы было утверждено после обобщения результатов большого количества экспериментов. Испытания проводились параллельно на кроликах и с помощью ЛАЛ-теста. При выборе был учтен тот факт, что кролики менее чувствительны к пирогенам, а также и то, что способность вызывать гелирование ЛАЛ-реактива в значительной степени зависит от природы (происхождения) эндотоксина. На практике загрязнителями лекарств являются не высокоочищенные препараты эндотоксина, а случайная «смесь» эндотоксинов, которые иногда называют «природными» эндотоксинами. В отдельных случаях вода с естественными эндотоксинами, в концентрациях в 8-16 раз выше допустимого уровня, обнаруживаемого с помощью ЛАЛ-теста, может не вызывать пирогенный ответ у кроликов. Из этого следует, что допустимая доза эндотоксина равная 5 ЕЭ/кг может считаться безопасной с большим запасом надежности.

Итак, значение 5 ЕЭ на 1 кг массы тела было принято в качестве основного коэффициента при расчете предельного содержания бактериальных эндотоксинов в инъекционных лекарственных препаратах. При средней массе человека - 70 килограмм общая допустимая доза эндотоксина составляет 350 ЕЭ. Понятие «пороговая пирогенная доза» подразумевает возможность возникновения пирогенного ответа, следовательно, реальное содержание эндотоксина в разовой терапевтической дозе испытуемого препарата должно быть меньше 350 единиц эндотоксина.

В Таблице приведены международные значения пороговой пирогенной дозы бактериальных эндотоксинов в зависимости от способа введения лекарственного препарата.

Препараты для парентерального введения	5 ЕЭ / кг / час
Препараты для введения интратекально	0,2 ЕЭ / кг / час
Препараты радиохимические для внутривенного использования	2,5 ЕЭ / кг / час (175 ЕЭ/V)
Препараты радиохимические для введения интратекально	(14 ЕЭ/V)

Примечание:

- Под парентеральным введением в данном случае подразумеваются все виды инъекций препаратов. Это внутривенное болюсное и внутривенное инфузионное введение, разные виды внутрисосудистых введений (внутрибрюшинное, внутриплевральное и др.), внутримышечное, подкожное и т.д. (Исключение составляет интратекальное введение - под оболочки головного и спинного мозга).

- Для радиофармацевтических препаратов предельное содержание бактериальных эндотоксинов, как правило, выражается не на кг веса, а на максимальную разовую дозу препарата на момент разведения (приготовления раствора), в формуле она обозначена буквой V.

- Для расчета содержания эндотоксина для препаратов, терапевтическая доза которых указывается на площадь тела, используется коэффициент пересчета. Средняя площадь тела принимается равной 1,8 м². Максимальная терапевтическая доза препарата в мг/м² умножается на 1,8 м², полученное значение делится на среднюю массу 70 кг, таким образом значение терапевтической дозы приводится к привычному выражению в мг/кг. Пример расчета приведен ниже.

Используя значение пороговой пирогенной дозы, можно рассчитать значение Предельного содержания бактериальных эндотоксинов для лекарственного средства по следующей формуле:

$$\text{Предельное_содержание_БЭ} = \frac{K}{M}, \text{ где}$$

K - пороговая пирогенная доза, зависящая от способа введения препарата,

M - максимальная терапевтическая доза препарата, вводимая с помощью этого способа введения в течение одного часа (в мг, мл, ЕД).

Можно привести несколько типовых примеров расчетов значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов.

Пример 1. Расчет предельного содержания бактериальных эндотоксинов для препарата, терапевтическая доза которого указана в мл раствора на кг.

Натрия хлорид **0,9% раствор для инъекций**

Максимальная терапевтическая доза (М) - 10 мл/кг/час

Способ введения – внутривенная инфузия.

Пороговая пирогенная доза (К) – 5 ЕЭ/кг/час

$$\text{Пред_сод_БЭ} = \frac{5 \text{ЕЭ/кг/час}}{10 \text{мл/кг/час}} = 0,5 \text{ЕЭ/мл}$$

Пример 2. Расчет предельного содержания бактериальных эндотоксинов для препарата, терапевтическая доза которого указана в мг активного вещества.

Цефазолин, порошок для приготовления раствора для инъекций.

Максимальная терапевтическая доза (М) - 33,3 мг/кг/час

Способ введения – внутримышечная и внутривенная инъекции.

Пороговая пирогенная доза (К) – 5 ЕЭ/кг/час

$$\text{Пред_сод_БЭ} = \frac{5 \text{ЕЭ/кг/час}}{33,3 \text{мг/кг/час}} = 0,15 \text{ЕЭ/мг}$$

Пример 3. Расчет предельного содержания бактериальных эндотоксинов для препарата, терапевтическая доза которого указана в мг активного вещества на м² площади тела.

Цисплатин, лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций

Максимальная терапевтическая доза (М) - 100 мг/м²/час

Способ введения – внутривенная инъекция
Пороговая пирогенная доза (К) – 5 ЕЭ/кг/час.

$$\text{Макс_доза (мг/кг)} = \frac{100 \text{мг/м}^2/\text{час} \times 1,8 \text{м}^2}{70 \text{кг}} = 2,57 \text{мг/кг/час}$$

$$\text{Пред_сод_БЭ} = \frac{5 \text{ЕЭ/кг/час}}{2,57 \text{мг/кг/час}} = 1,9 \text{ЕЭ/мг}$$

Как следует из приведенных примеров, предельное содержание бактериальных эндотоксинов может быть выражено в единицах эндотоксина на миллилитры, миллиграммы или единицы активного

вещества. Наиболее частый способ выражения значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов – на весовые единицы активного вещества. Выражение предельного содержания в виде концентрации бактериальных эндотоксинов в растворе (ЕЭ/мл) наиболее удобно. Однако, такой способ выражения предельного содержания БЭ не всегда целесообразен. Для лекарственных препаратов, выпускаемых в виде порошка или лиофилизата для приготовления инъекций, или же для субстанций, выражение содержания бактериальных эндотоксинов в виде концентрации в растворе, вообще не имеет смысла. В этом случае в НД или в ФС должен приводиться способ подготовки образца для анализа.

В качестве примера можно привести формулировку раздела «Бактериальные эндотоксины» для *Цефазолина для инъекций* из Британской фармакопеи 2001 [2].

Бактериальные эндотоксины.

Провести анализ на содержание бактериальных эндотоксинов в соответствии с главой 2.6.14 «Бактериальные эндотоксины». Растворить содержание закрытого контейнера в воде для ЛАЛ-теста до получения раствора цефазолина с концентрацией 10 мг/мл (раствор А). Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в растворе А - не более 1,5 ЕЭ/мл. Анализ проводится для максимально допустимого разведения раствора А с учетом используемой чувствительности ЛАЛ-реактива.

Аналогичный раздел для *Цефазолина для инъекций* в Фармакопее США 26 издания [3] значительно лаконичнее:

Бактериальные эндотоксины < 85 > – Содержание бактериальных эндотоксинов не более 0,15 Единиц Эндотоксина в мг цефазолина.

Видно, что разделы отличаясь по форме одинаковы по содержанию. Однако, первый пример более информативен.

Проверка лекарственного препарата становится возможной после утверждения значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов. При утверждении значения предельного содержания БЭ анализируются данные, приведенные в инструкции к препарату и одновременно накопленный опыт по данным для аналогичных препаратов, в том числе описанных в зарубежных фармакопеях. Если препарат не описан фармакопеях, приходится опираться только на инструкцию по медицинскому применению препарата. К сожалению, инструкции часто отличаются друг от друга. Те дозы, которые приняты за рубежом, не описаны в отечественных инструкциях или для них указан другой

способ введения (более короткая или более длительная инфузия). Иногда может быть исключен один из путей введения, например, интратекальный.

В качестве простого примера различий можно привести весьма популярный препарат «Диклофенак 2,5% раствор для инъекций». У нас в стране зарегистрировано более 80 препаратов разных производителей отечественных и зарубежных. Препарат не описан в фармакопее США, нет статьи на такую лекарственную форму и в Европейской фармакопее. Следовательно, расчеты можно делать, исходя только из данных приведенных в инструкциях. Вот тут и проявляются различные дозы введения препарата, которые приводят к разным значениям содержания БЭ. В части инструкции указывается, что максимальная разовая доза составляет 75 мг или содержимое одной ампулы. Следовательно, содержание БЭ будет равно:

$$\frac{350 \text{ ЕЭ} / \text{час}}{75 \text{ мг} / \text{час}} = 4,67 \text{ ЕЭ} / \text{мг}$$

Вместе с тем есть инструкции, в которых указывается, что максимальная разовая доза может составлять 150 мг, то есть содержимое двух ампул, которое вводится одновременно. Соответственно, содержание БЭ для таких препаратов должно составлять значение вдвое меньшее, а именно 2,33 ЕЭ/мг. Такой дуализм и закреплен в настоящее время в существующей документации. Часть препаратов проверяется на содержание меньшее 4,67 ЕЭ/мг, а часть - 2,33 ЕЭ/мг.

Безусловно, гораздо удобнее, когда норма введена в монографию фармакопеи, в этом случае производители могут ориентироваться на уже утвержденное значение. Тогда для частных ФСП может быть утверждено значение равное значению принятому национальной фармакопеей или меньшее. Действительно, качество продукции должно быть не хуже общепринятого значения, а в том случае, если производитель уверен в качестве своей продукции, он может устанавливать новые, более жесткие нормы. Однако, даже это внешне очень логичное правило иногда может завести в тупик. В качестве иллюстрации проблем, которые могут возникнуть при указании очень низкого предельного содержания бактериальных эндотоксинов можно привести значение 0,6 ЕЭ/г, установленное зарубежной компанией-производителем для субстанции хлорида натрия. Для проведения анализа нужно приготовить раствор с известной концентрацией, рассчитать значение предельного содержания БЭ в этом растворе и провести анализ. Однако непосредственно проверить 5% и 10% раствор натрия хлорида невозможно из-за ингибирования реакции. Если же довести концентрацию хлорида

натрия до 0,9%, то в таком растворе концентрация БЭ должна быть меньше 0,0054 ЕЭ/мл, что за пределом чувствительности гель-тромб теста. В данном примере очевидный плюс – ужесточение нормы содержания БЭ превращается в непреодолимое препятствие для проведения анализа. Вообще, для субстанций устанавливаются значения содержания БЭ, близкие к значениям принятым для готовых форм. Так, для готовой лекарственной формы «Натрия хлорид раствор 0,9%» установлено предельное содержание БЭ не более 0,25 ЕЭ/мл в Британской и Европейской Фармакопеех [2, 4] и не более 0,5 ЕЭ/мл в Фармакопее США [4]. А для субстанции же «Натрия хлорид» в Европейской фармакопее [4] принято значение равное 5 ЕЭ/г. Если пересчитать это значение на содержание БЭ в приготовленном из субстанции 0,9% растворе, то содержание БЭ в нем должно быть не более 0,045 ЕЭ/мл. Это пример разумных требований – для субстанции они выше, чем для готовой формы, вместе с тем эти требования вполне реалистичны и могут быть проверены.

Можно отметить также, что натрия хлорид является очень благополучным объектом в смысле содержания бактериальных эндотоксинов. В принципе можно получить субстанцию любой чистоты, поскольку хлорид натрия выдерживает прокалывание в сухожаровом шкафу при режимах, гарантирующих депирогенизацию. Но это не означает, что в документации нужно указывать значения, которые невозможно проверить.

Выше уже отмечалось, что содержание БЭ может быть выражено в виде концентрации эндотоксинов в растворе или в весовых единицах активного вещества. Особой разницы между этими способами выражения содержания БЭ нет. Тем не менее, необдуманный подход к выбору способа выражения содержания БЭ и, возможно, непонимание сути этого показателя, может привести к серьезным проблемам. Например, в ФСП одного из отечественных производителей указано единое значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов для растворов глюкозы разных концентраций (5%, 10% и 20%) - не более 0,5 ЕЭ/мл. С первого взгляда выставленная норма не должна вызывать возражений, поскольку она соответствует общепринятым значениям для раствора глюкозы с концентрацией 5% - не более 0,5 ЕЭ/мл, а для 10% и 20% эта величина даже имеет запас «прочности». Первая трудность состоит в том, что, что глюкоза способна ингибировать реакцию, и если с 5% глюкозой вопросов может и не возникнуть, то более концентрированные растворы придется разводить водой для ЛАЛ-теста. Но степень этого разведения ограничена, в итоге нельзя исключить того, что наиболее

концентрированные растворы вообще нельзя будет проверить с помощью геле-тромб теста. Надо учитывать и то обстоятельство, что глюкоза, в отличие от хлорида натрия, не столь благополучный препарат. Она является хорошей средой для роста микроорганизмов. Возможно поэтому, будет трудно удержать содержание эндотоксинов в рамках значения, заявленного для растворов с высокой концентрацией глюкозы.

В итоге производитель сам себе создал, как минимум две проблемы, – сложности с проведением анализа и возможность выбраковки серий, которые, по сути, могут считаться хорошими.

Как завершение разговора о глюкозе можно привести выдержку из монографии для растворов глюкозы для инъекций разных концентраций Фармакопеи США [3] для «Декстрозы для инъекций»

Бактериальные эндотоксины < 85 > - содержание должно быть менее 0,5 единиц эндотоксина в мл для инъекционных растворов, содержащих менее 5% декстрозы и не более 10,0 единиц эндотоксина на 1 г для инъекционных растворов содержащих от 5% до 70% декстрозы. [ВНИМАНИЕ – перед анализом развести инъекционные растворы, содержащие более 10% декстрозы до раствора с концентрацией 10%].

В этом разделе есть предупреждение о возможном ингибировании, поэтому предлагается разводить концентрированные растворы до 10% раствора (однако, и этого может оказаться недостаточно). Что касается предельного содержания БЭ, то оно выражено на весовые единицы и увязано с максимальной разовой дозой глюкозы и, следовательно с концентрацией раствора, который используется для введения этой дозы.

Еще пример трудностей в расчетах – различные схемы введения препарата, который может выпускаться в разных формах (концентрациях). В этом случае для расчета предельного содержания БЭ надо выбирать дозу препарата **наибольшую из всех возможных**. Например, препарат «Новокаин раствор для инъекций» выпускают в различных концентрациях 0,25%, 0,5%, 1% и 2%. В инструкции по медицинскому применению приводится длинный перечень способов введения препарата. При этом в каждом случае он используется в определенной концентрации. Понятно, что при необходимости применения 2% раствора для спинномозговой анестезии невозможно использовать 0,25% раствор препарата. Но такой раствор для инфузионной анестезии может быть приготовлен медицинским персоналом ex tempore из более концентрированного препарата. Кроме этого

надо учитывать то, что растворы новокаина всех концентраций должны быть изготовлены из субстанции одинакового качества. Поэтому для выбора значения предельного содержания БЭ для препарата «Новокаин раствор для инъекций» опираться следует на максимальную терапевтическую дозу с пересчетом на весовые единицы активного вещества.

Максимальная терапевтическая доза (М) – 2,5 г/час, используемая в процедуре инфузионной анестезии с помощью 0,25% препарата.

Способ введения – подкожная, внутривенная или внутримышечная инъекция.

Пороговая пирогенная доза (К) – 5 ЕЭ/кг/час

$$\text{Пред_сод_БЭ} = \frac{5 \text{ ЕЭ / кг / час} \times 70 \text{ кг}}{2500 \text{ мг / кг / час}} = 0,14 \text{ ЕЭ / мг}$$

Расчет предельного содержания БЭ является первым шагом на пути введения раздела «Бактериальные эндотоксины» для лекарственного средства. После теоретических расчетов возможность использования выбранного значения предельного содержания БЭ должна быть подтверждена экспериментально в соответствии с ОФС 42-0002-00. Это означает выявление области разведений препарата, где обнаруживаются БЭ или действуют мешающие факторы, выбор и валидация рабочего разведения. В отдельных случаях приходится изыскивать приемы удаления или нейтрализации мешающих факторов. Хочется отметить, что грамотное проведение этих исследований гарантирует от многих перечисленных выше ошибок и досадных недоразумений.

Хочется добавить, что многие поднятые в данной статье вопросы могут быть решены только в том случае, если введение значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов будет решаться не только на уровне ФСП, но и на уровне ФС на препараты. Полезен был бы и реестр препаратов, для которых уже утверждены значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов.

В заключении приведены некоторые общие положения, которые надо учитывать при расчете и утверждении значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственных средствах.

- *Предельное содержание бактериальных эндотоксинов должно соответствовать максимальной терапевтической дозе лекарственного средства.*
- *Существует практика, по которой приняты фармакопеями*

значения становятся стандартом де-факто, даже, если они, менее расчетного значения. Наиболее полный список препаратов, проверяемых с помощью ЛАЛ-теста можно найти в Фармакопее США. Субстанции лучше представлены в Европейской Фармакопее.

- При расчете предельного содержания бактериальных эндотоксинов, как правило, не учитывается возможность одновременного введения нескольких лекарственных препаратов, соответственно, игнорируется и возможность получения пациентом суммарного количества эндотоксинов, превышающего пороговую пирогенную дозу.

- Как правило, для субстанций, используемых для приготовления инъекционных лекарственных форм, принимаются значения соответствующие предельному содержанию бактериальных эндотоксинов для готовых форм.

- В некоторых случаях значения предельно допустимого содержания бактериальных эндотоксинов, указанные в частных статьях, могут быть более жесткими, чем расчетные значения.

Литература.

"Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". // U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

British Pharmacopoeia, London 2001.

The United States Pharmacopoeia, 26-th Ed. 2003.

European Pharmacopoeia, III Ed., Strasbourg France. Supp. 2001.

Максимально допустимое разведение

Ситников. А. Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №2 (17) 2007

Понятие максимально допустимого разведения (МДР) является одним из фундаментальных понятий, играющих важную роль в обеспечении безопасности лекарственного препарата при проверке его с помощью ЛАЛ-теста. Особенно тесно это понятие связано с модификацией метода, называемой гель-тромб тест. Оно и возникло

фактически одновременно с этим методом. Уже в первой редакции фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США вводилось определение Maximum Valid Dilution (MVD) и, в частности, указывалось следующее:

«.....Понятие Максимально Допустимого Разведения применимо к Инъекционным лекарственным формам или Растворам для парентерального введения в готовой или разведенной для введения форме...»

В том случае, если в частной статье норма содержания эндотоксина указана в объемных единицах (ЕЭ/мл), для получения значения МДР разделите указанную норму на λ , которая является заявленной чувствительностью лизата, используемого в методе....»

.....Полученное таким образом значение МДР является предельным значением разведения испытуемого препарата, при котором проводимый тест можно считать достоверным...»

Близкое по смыслу понятие «Кратность предельного разведения» использовалось в первой редакции отечественной статьи «Определение бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест)». Правда, смысл этого термина не был достаточно конкретизирован. Позже в ОФС «Бактериальные эндотоксины» был введен иной термин - МДР, при этом уже очень четко было определено и место этого понятия в структуре анализа.

Вообще, словосочетание *Maximum Valid Dilution (MVD)*, используемое в англоязычной литературе, может быть переведено как *Максимально Достоверное Разведение* или *Максимальное Валидируемое Разведение*. Каждый из этих вариантов по-своему верен, впрочем, это относится и к принятому в ОФС определению «Максимально допустимое разведение». Конечно, важны не семантические тонкости перевода, а тот смысл, который вкладывается в этот термин.

Сама природа гель-тромб теста предполагает получение качественного результата, демонстрации того, что содержание эндотоксина больше/меньше какой-либо величины. Так, если исходный раствор препарата проверяют без разведения, то по результатам можно сделать вывод о том, что содержание эндотоксинов равно/больше λ или менее λ . Однако, в большинстве случаев исходный раствор препарата разводят водой. Причины тут две. Первая: относительно высокая чувствительность ЛАЛ-реактива. Если для ЛС установлено предельное содержание БЭ - не более 30 ЕЭ/мл, совсем необязательно показывать, что эндотоксинов в препарате меньше 0,03 ЕЭ/мл. Вторая причина более веская: это ингибирование реакции со стороны препарата. Самый простой способ преодоления этого ингибирования - разведение исходного раствора водой. При разведении происходит снижение концентрации активного вещества и, соответственно, снижение ингибирующей способности. При этом же происходит и снижение концентрации эндотоксинов в

препарате, если таковые там имеются, но благодаря высокой чувствительности ЛАЛ-реактива сохраняется возможность их определения. Понятно также, что если степень разведения никак не ограничивать, то концентрацию эндотоксинов в растворе препарата можно снизить настолько, что она окажется меньше значения λ . Можно привести следующий пример:

Предельное содержание БЭ не более 25 ЕЭ/мл.

$\lambda = 0,25 \text{ ЕЭ/мл}$.

Препарат проверяется в одном произвольно выбранном разведении, например, 1/1; 1/10; 1/100 или 1/1000.

Отрицательные результаты могут быть интерпретированы следующим образом:

Разведение	Сод. БЭ	Качество ЛС
1/1	< 0,25 ЕЭ/мл	хорошее
1/10	< 2,5 ЕЭ/мл	хорошее
1/100	< 25 ЕЭ/мл	норма
1/1000	< 250 ЕЭ/мл	неизвестно

Если же получены положительные результаты, то они могут быть оценены следующим образом:

Разведение	Сод. БЭ	Качество ЛС
1/1	$\geq 0,25 \text{ ЕЭ/мл}$	неизвестно
1/10	$\geq 2,5 \text{ ЕЭ/мл}$	неизвестно
1/100	$\geq 25 \text{ ЕЭ/мл}$	Брак
1/1000	$\geq 250 \text{ ЕЭ/мл}$	Брак

Сразу заметно, что в этом ряду есть совершенно бесполезное разведение 1/1000. Если в нем результаты отрицательные, то никаких выводов сделать невозможно, если положительные, то это заведомый брак. Два первых разведения имеют разную значимость в зависимости от того, какие результаты получены. Если результаты отрицательные, то это очень хорошо, если положительные, то без перестановки определить качество препарата невозможно. И, наконец, в разведении 1/100 качество препарата однозначно трактуется в зависимости от результата анализа. Если результат положительный, то это брак, если результат отрицательный, то препарат соответствует требованиям НД. Видно также, что это как раз тот рубеж, за который переходить не имеет никакого смысла, поскольку в больших разведения результаты невозможно будет нормально оценить. Вот собственно это, пограничное разведение и называется МДР.

МДР и чувствительность ЛАЛ-реактива, λ .

Значение МДР рассчитывается по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов}}{\lambda}$$

λ - Чувствительность ЛАЛ-реактива [ЕЭ/мл].

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов - значение, указанное в частной фармакопейной статье на препарат [ЕЭ/мл].

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов должно быть выражено в виде концентрации эндотоксина в растворе в ЕЭ/мл, т.е. в той же размерности, в которой выражается чувствительность ЛАЛ-реактива, λ в ЕЭ/мл. Значение МДР зависит от чувствительности ЛАЛ-реактива: чем выше чувствительность, тем больше МДР.

Например,

Предельное содержание не более 0,5 ЕЭ/мл

Чувствительность ЛАЛ-реактива	МДР
0,25 ЕЭ/мл	2
0,125 ЕЭ/мл	4
0,0625 ЕЭ/мл	8
0,03125 ЕЭ/мл	16

Значение МДР - величина безразмерная. Обычно в протоколах анализов степень разведения препарата обозначают в виде простой дроби: 1/4, 1/64 и т.д.

Согласно положениям ОФС анализ не может быть проведен в разведении большем, чем МДР. Это положение в равной степени относится к обеим модификациям геля-тромб теста. Особенно оно важно в количественном анализе, поскольку может возникнуть искушение продолжить ряд разведений за МДР. В этом случае теоретически возможна следующая картина:

Предельное содержание эндотоксинов - не более 0,5 ЕЭ/мл,

$\lambda - 0,03 \text{ ЕЭ/мл}$,

$\text{МДР} = 16$.

1/4	1/8	1/16	1/32	Конечная точка
+	+	+	-	0,5 ЕЭ/мл
+	+	-	-	0,25 ЕЭ/мл

Среднее геометрическое значение содержания БЭ = 0,35 ЕЭ/мл.

Формально полученное значение меньше, чем допустимая норма, и препарат можно было бы пропустить. Однако если бы препарат был проверен с помощью Качественного анализа в МДР, то по полученным результатам следовало бы

провести повторный анализ с весьма высокой вероятностью выбраковки серии.

Минимально допустимая концентрация.

Для лекарственных форм, производимых в виде лиофилизатов, порошков или лекарственных субстанций, для которых содержание эндотоксинов выражено в ЕЭ/мг, более информативным является значение *Минимально допустимой концентрации, МДК (Minimum valid concentration)*. По сути, МДК и МДР это одно и то же, просто в зависимости от общего контекста в одном случае удобнее говорить о разведении препарата, в другом - о концентрации активного вещества в этом разведении. Понятно, что зависимость обратная: в максимальном разведении концентрация активного вещества минимальна.

Значение Минимально допустимой концентрации, так же как и МДР, зависит от чувствительности ЛАЛ-реактива и предельного содержания эндотоксинов в препарате. Значение МДК рассчитывается следующим образом:

$$\text{МДК} = \frac{\lambda}{\text{Предельное содержание бактериальных эндотоксинов}}$$

Например:

Предельное содержание БЭ не более 1 ЕЭ/мг.

$\lambda = 0,25 \text{ ЕЭ/мл}$.

$$\text{МДК} = \frac{0,25 \text{ ЕЭ/мл}}{1 \text{ ЕЭ/мг}} = 0,25 \text{ мг/мл}$$

Для перевода МДК в МДР используется формула:

$$\text{МДР} = \frac{\text{Концентрация препарата}}{\text{МДК}}$$

Концентрация препарата - концентрация исходного раствора препарата [мг/мл].

Так, например, если в приведенном выше примере концентрация активного вещества в исходном растворе составляет 10 мг/мл, то значение МДР будет равно:

$$\text{МДР} = \frac{10 \text{ мг/мл}}{0,25 \text{ мг/мл}} = 40$$

Если же сделать расчеты МДР для этого препарата «традиционным способом», то получится то же самое значение:

$$\text{МДР} = \frac{10 \text{ мг/мл} \times 1 \text{ ЕЭ/мг}}{0,25 \text{ ЕЭ/мл}} = 40$$

Поскольку в большинстве случаев содержание эндотоксинов в препаратах выражается в ЕЭ/мг, возможно, правильнее было бы оперировать именно понятием минимальной концентрации. Особенно это актуально для порошков или субстанций, для

которых упоминание о максимальной степени разведения возможно только после указания их концентрации в исходном растворе. Поэтому не случайно, что в первых редакциях Фармакопеи США и в Руководстве FDA по валидации метода понятие МДК использовалось наряду с МДР.

В действующей Гармонизированной статье «Бактериальные эндотоксины» и в отечественной документации понятие Минимально допустимая концентрация не используется. Объясняется это тем, что в практической работе удобнее и понятнее оказалось использование значения МДР.

МДР и фактор безопасности.

В нормативной документации и протоколах анализов обычно указывается значение МДР и значение разведения препарата в опыте. Часто испытываемое разведение значительно меньше МДР. Так гарантируется большая безопасность проверенного препарата. Само же понятие «фактор безопасности» практически не используется, несмотря на то, что в определенных ситуациях оно может быть очень уместно. Дело в том, что общая идеология проверки готовой формы заключается не в том, чтобы забраковать препарат, а в том, чтобы убедиться в его безопасности для человека.

Например:

Предельное содержание БЭ не более 0,5 ЕЭ/мл,

$\lambda = 0,03 \text{ ЕЭ/мл}$,

МДР равно 16.

Допустим, в каждом из возможных разведений могут быть получены отрицательные результаты:

Отрицательный результат в разведении:	Содержание БЭ
1/1	менее 0,03 ЕЭ/мл
1/2	менее 0,06 ЕЭ/мл
1/4	менее 0,125 ЕЭ/мл
1/8	менее 0,25 ЕЭ/мл
1/16	менее 0,5 ЕЭ/мл

Какой из данных результатов предпочтительнее? Очевидно, что это отрицательный результат, полученный для препарата без разведения. Этот результат означает, что в препарате содержание эндотоксинов гарантированно меньше предельного в 16 раз. В этом случае говорят, что фактор безопасности результатов опыта равен шестнадцати.

Знакомая рекомендация проверять препарат в разведениях, меньших расчетного значения МДР: хотя бы в 1/2 МДР, это не что

иное, как призыв обеспечить фактор безопасности результатов, равный двум.

Конечно, само понятие «фактор безопасности» далеко не идеально, хотя бы потому, что реакция человека на эндотоксины не линейна. И все же этот термин очень удачно смотрится именно в базовых документах, сопровождающих разделы БЭ в ФСП. Так, если в Пояснительной записке к ФСП или в СОПе указано, что выбранная схема проверки готовой формы обеспечивает фактор безопасности, равный десяти, смысл послания оказывается абсолютно ясным и без пересчетов степеней разведения.

Разведения ЛС в кинетических анализах.

Весьма интересна ситуация с МДР в кинетических анализах. Основное отличие состоит в том, что проверка идет не по одной концентрации, а для широкого их ряда. В этих анализах за λ принимается наименьшая концентрация КСЭ, используемая для построения калибровочной кривой. Например:

Предельное содержание БЭ не более 10 ЕЭ/мл.

*Калибровочная кривая строится по трем концентрациям: 0,05 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 5 ЕЭ/мл,
 $\lambda = 0,05$ ЕЭ/мл;*

$$\text{МДР} = \frac{10 \text{ ЕЭ/мл}}{0,05 \text{ ЕЭ/мл}} = 200$$

Поскольку калибровочная кривая позволяет определить концентрацию эндотоксина в довольно широком диапазоне, эту возможность желательно использовать по максимуму. Поэтому кроме МДР можно рассчитать и значение разведения для наибольшей концентрации эндотоксина в калибровочной кривой (5 ЕЭ/мл), в этом случае разведение будет равно 2. Далее можно решить, в каком разведении поставить анализ. Очевидно, что ставить опыт в разведении 1/200 совершенно неинтересно. Если вынести за скобки вопрос возможного ингибирования реакции, то наиболее интересные и информативные результаты будут получены при анализе препарата в разведении 1/2. Какие могут быть результаты, и как они могут быть интерпретированы?

1. Если содержание эндотоксинов в препарате очень низкое, по результатам будет сделан вывод, что оно менее 0,1 ЕЭ/мл (фактор разведения, умноженный на минимальную концентрацию КСЭ в калибровочной кривой).

2. Если содержание эндотоксинов в препарате высокое, по результатам будет сделан вывод, что оно более 10 ЕЭ/мл (фактор разведения, умноженный на максимальную концентрацию КСЭ в калибровочной кривой).

3. Если в препарате присутствуют эндотоксины в диапазоне, измеряемом калибровочной кривой, по результатам анализа будет получена конкретная цифра, например, 1 ЕЭ/мл.

Если вернуться к вопросу фактора безопасности, то в первом случае этот фактор равен 100, т.к. содержание эндотоксинов в 100 раз менее допустимого уровня. В третьем случае фактор безопасности менее 10, что впрочем, вполне приемлемо. И, наконец, во втором примере препарат бракуется.

Приведенный пример лишний раз подчеркивает то, насколько более информативны кинетические анализы. В гел-тромб тесте приходится выбирать одно разведение, причем такое, в котором полученные результаты были бы действительно безопасными, а требования по качеству не были излишне жесткими. Если гипотетические представления о содержании эндотоксина в препарате окажутся неверными, опыт придется переставлять. В кинетических же анализах делать такие расчеты значительно проще, поскольку измерения проводятся для широкого диапазона концентраций, а оценка степени безопасности делается по результатам анализа и может опираться на конкретные цифры.

Заключение

Расчеты МДР - важный элемент теоретических расчетов, определяющих естественные ограничения опыта. Конечно, технически не всегда возможно проверить препарат в очень малых разведениях, а при проверке неизвестного препарата такие эксперименты могут привести к необходимости перестановки опыта. Но в любом случае «добровольно-обязательная» рекомендация проводить анализ в разведении, меньшем МДР, хотя бы в 1/2 МДР, стала уже нормой, которая ни у кого не вызывает возражений.

Гель-тромб тест, чувствительность ЛАЛ-реактива и метода

Чиркова М.Н., Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» № 3(10) 2005

Чувствительность препаратов ЛАЛ-реактива, используемого для проведения гел-тромб теста, обозначается греческой буквой λ (лямбда). Традиционно используются препараты следующего ряда чувствительностей: 0,25 ЕЭ/мл, 0,125 ЕЭ/мл, 0,06 ЕЭ/мл и 0,03 ЕЭ/мл. В этом ряду чувствительность реактива увеличивается слева направо. Т.е. самая низкая чувствительность 0,25 ЕЭ/мл, самая высокая чувствительность 0,03 ЕЭ/мл. Это стандартный диапазон, выпускаемый всеми производителями ЛАЛ-реактива. Можно

встретить реактивы как с очень низкой, так и с очень высокой чувствительностью, например, 0,5 ЕЭ/мл (*0.2 ml/single test vial, Associates of Cape Cod*) или 0,015 ЕЭ/мл (*5,2 ml/vial, Charles River Laboratories*).

Чувствительность ЛАЛ-реактива определяет и чувствительность метода. Действительно, минимальная концентрация эндотоксина, которую можно определить с помощью геле-тромб теста, соответствует чувствительности используемого в анализе ЛАЛ-реактива. Максимальная чувствительность метода, соответственно, равна наибольшей чувствительности ЛАЛ-реактива. Если не брать в расчет весьма редкий реактив с чувствительностью 0,015 ЕЭ/мл, принято считать, что минимальная концентрация эндотоксина, которую можно зарегистрировать с помощью геле-тромб теста, равна 0,03 ЕЭ/мл.

Ряд из четырех разных чувствительностей предполагает возможность выбора наиболее подходящего реактива для каждого конкретного случая. Интересно, что сама эта возможность выбора порождает проблему – что именно выбрать? Однозначного ответа на этот вопрос, пожалуй, нет. С уверенностью можно сказать, что наибольшей популярностью пользуются реактивы с высокой чувствительностью – 0,06 ЕЭ/мл и 0,03ЕЭ/мл. В Европе пальму первенства держит реактив с чувствительностью 0,06 ЕЭ/мл, в Америке более популярна чувствительность 0,03 ЕЭ/мл. У нас основная доминанта та же – 0,03 ЕЭ/мл. Почему?

Логику выбора наиболее чувствительных препаратов довольно легко проследить. На первый взгляд, кажется целесообразным иметь в запасе реактивы разных чувствительностей, каждый реактив под свою конкретную задачу. Так, если для испытуемого препарата допустим высокий уровень содержания эндотоксинов, например, 10 ЕЭ/мл, логичнее использовать реактив с низкой чувствительностью. Более чувствительный реактив можно использовать для инфузионных растворов, для которых нормой является 0,5 ЕЭ/мл или 0,25 ЕЭ/мл. Очевидный плюс от такого разделения обязанностей – сокращение времени на подготовку образцов. Но в тоже время, минусов, возможно не столь очевидных, набирается гораздо больше. Необходимо не только поддерживать достаточные запасы реактивов разной чувствительности, но и учитывать запасы КСЭ. Стандарт эндотоксина жестко связан с конкретной серией ЛАЛ-реактива, к тому же чувствительность каждой пары ЛАЛ/КСЭ необходимо проверять. Собственные инструкции по проведению анализов или СОПы желательно делать как можно более подробными, указывая чувствительность используемого реактива. Соответственно будут и разные СОПы на проверку чувствительности, разные схемы

подготовки растворов КСЭ, испытуемых препаратов и т.д. Если принять все это во внимание, то тот выигрыш в пробоподготовке, который можно получить от использования реактивов разных чувствительностей, уже не кажется столь значительным. Действительно, вся разница – это одно или два лишних разведения (пара пробирок и несколько миллилитров воды). Поэтому логичнее все же остановиться на каком-то одном реактиве.

На каком? С одной стороны, чем меньше чувствительность реактива, тем менее заметны собственные ошибки, и менее жесткие требования к воде и посуде. Это кажется безусловным плюсом. Но, с другой стороны, чем больше чувствительность, тем больше значение МДР, следовательно, больше шансов преодолеть ингибирование, если таковое имеет место. Более того, если кроме простого качественного анализа возникает необходимость проведения количественного определения эндотоксинов, то в этом случае высокая чувствительность реактива тоже оказывается предпочтительнее. Действительно, на производстве, кроме контроля готовых форм, необходимо проверять сырье, субстанции и, главное, воду. Тут без чувствительности 0,03 ЕЭ/мл (в крайнем случае 0,06 ЕЭ/мл) никак не обойтись. Вот, собственно, очень простое объяснение популярности реактивов с высокой чувствительностью. У нас это предпочтение выражается во всеобщей любви к реактиву с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл.

Но если уж мы говорим о чувствительности реактивов, то нельзя не коснуться еще одного связанного со значением чувствительности вопроса, который представляется важным и имеет отношение к правилам расчета значения МДР и концентрации эндотоксина, определенной в опыте.

Но сначала о том, как калибруется новая серия ЛАЛ-реактива и откуда берутся те цифры, которые указаны на этикетке. Чувствительность каждой серии ЛАЛ-реактива определяется производителем по Международному стандарту эндотоксина. Обычно в опыте проверяются растворы стандарта эндотоксина, начиная с концентрации 1,0 ЕЭ/мл. Традиционно используется серия убывающих концентраций эндотоксина, в которой каждое следующее значение меньше предыдущего в два раза. В результате получается ряд разведений эндотоксина, соответствующий концентрациям: 1,0 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 0,25 ЕЭ/мл, 0,125 ЕЭ/мл, 0,0625 ЕЭ/мл, 0,03125 ЕЭ/мл, 0,015625 ЕЭ/мл и 0,0078125 ЕЭ/мл. Конечная точка реакции, т.е. наименьшая концентрация эндотоксина, при которой происходит гелирование проверяемой серии ЛАЛ-реактива, и соответствует его чувствительности, которая затем указывается на этикетке. Это классическое описание

калибровки ЛАЛ-реактива, проводимой всеми компаниями-производителями. Здесь хочется сделать одно отступление теоретического порядка. Нельзя не обратить внимания на то, что чувствительность любого реактива ВСЕГДА соответствует одному из приведенных выше фиксированных значений и никогда не бывает промежуточной. Есть реактив с чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл или с чувствительностью 0,25 ЕЭ/мл, но никто никогда не видел ЛАЛ-реактива с чувствительностью, скажем 0,175 ЕЭ/мл или 0,22 ЕЭ/мл. А ведь при калибровке серии проверяется несколько флаконов реактива, и опыт ставится не в четырех повторностях. В таком опыте определяется множество конечных точек – результатов для каждой повторности, которых может быть до двадцати. По этим результатам должно рассчитываться усредненное значение, которое и представляет собой чувствительность реактива. Следовательно, при проведении калибровки во всех повторностях ВСЕГДА получаются одинаковые результаты. Такие результаты являются следствием хорошо отлаженной технологии производства реактива и доведения его чувствительности, а также хорошей стабильности готового лиофилизированного препарата.

Вопрос о том, каким образом калибруют реактив, представлял бы сугубо теоретический интерес, если бы не одна, на первый взгляд, незначительная деталь – значения чувствительности 0,03 ЕЭ/мл и 0,06 ЕЭ/мл округленные. Почему полученные цифры округляют, понять легко, вспомнив, что допустимая ошибка метода составляет 50-200%. Действительно, зачем указывать значение чувствительности ЛАЛ-реактива с точностью до пятого знака после запятой, если он позволяет определить концентрацию эндотоксина лишь приблизительно. Несмотря на это, знание реальной чувствительности ЛАЛ-реактива может найти вполне практическое применение в практике повседневной работы. Сказанное можно проиллюстрировать несколькими примерами.

При расчете значения МДР предельное содержание эндотоксинов в препарате делят на чувствительность ЛАЛ-реактива. Использование реального значения, как правило, дает целые, а не дробные значения.

Например:

1. Вода для инъекций – предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0,25 ЕЭ/мл

$$\text{А) МДР} = \frac{0,25 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03 \text{ ЕЭ/мл}} = 8,3333$$

$$\text{Б) МДР} = \frac{0,25 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 8$$

2. Раствор глюкозы 5% – предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0,5 ЕЭ/мл

$$\text{А) МДР} = \frac{0,5 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03 \text{ ЕЭ/мл}} = 16,6667$$

$$\text{Б) МДР} = \frac{0,5 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 16$$

3. Анальгин раствор для инъекций 50% – предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 0,14 ЕЭ/мл (70 ЕЭ/мл)

$$\text{А) МДР} = \frac{70 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03 \text{ ЕЭ/мл}} = 2333,3333$$

$$\text{Б) МДР} = \frac{70 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 2240$$

4. Ранитидин раствор для инъекций 25 мг/мл – предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 7 ЕЭ/мл (175 ЕЭ/мл)

$$\text{А) МДР} = \frac{175 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03 \text{ ЕЭ/мл}} = 5833,333$$

$$\text{Б) МДР} = \frac{175 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 5600$$

Разница заметна, получаются не только целые цифры, но и более низкие значения МДР, что особенно важно, поскольку анализ не может быть проведен в разведении, большем МДР. Конечно, здравый смысл позволяет не делать глупостей, например, разводить глюкозу в 16,6667 раз. Даже когда анализ ставят в МДР, стараются выбирать округленное значение, близкое к расчетному. В приведенном примере анальгин проще проверять в разведении 1/2000, и в этом случае не важно – равно МДР 2240 или 2333,3333. В тоже время, может возникнуть искушение поставить ранитидин в разведении 1/5800 вместо 1/5600. А это уже пусть не очень серьезная, но ошибка.

При проведении обратной операции, т.е. при расчете значения концентрации эндотоксинов, также лучше использовать реальные значения чувствительности ЛАЛ-реактива. Например:

Количественный анализ раствора глюкозы 5% с ЛАЛ-реактивом 0,03 ЕЭ/мл:

1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
+	+	+	+	-
+	+	+	+	-

Конечная точка получена для разведения 1/8, следовательно, концентрация эндотоксинов будет равна фактору разведения, умноженному на чувствительность ЛАЛ-реактива. Если мы будем использовать значение чувствительности, указанное на этикетке, т.е.

0,03 ЕЭ/мл, то концентрация эндотоксина, определенная в опыте, будет равна 0,24 ЕЭ/мл ($8 \times 0,03 \text{ ЕЭ/мл} = 0,24 \text{ ЕЭ/мл}$). Если же использовать реальное значение чувствительности, то получается иная цифра – 0,25 ЕЭ/мл. Разница значений тем больше, чем больше степень разведения. Так, если в количественном анализе раствора анальгина конечная точка будет получена в разведении 1/512, то расчетное значение концентрации будет равно 15,36 ЕЭ/мл ($512 \times 0,03 \text{ ЕЭ/мл}$) или 16,0 ЕЭ/мл ($512 \times 0,03125 \text{ ЕЭ/мл}$). Вторая цифра более точная. Наконец, стоит обратить внимание еще на одно обстоятельство: в случае использования реального значения чувствительности ЛАЛ-реактива результаты анализов, проведенных реактивами разной чувствительности, должны полностью совпадать. Например, если тот же раствор глюкозы проверить ЛАЛ-реактивом с чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл, может получиться примерно следующая картина:

1/1	1/2	1/4
+	+	-
+	+	-

Концентрация эндотоксинов равна 0,25 ЕЭ/мл ($2 \times 0,125 \text{ ЕЭ/мл}$). Таким образом, результаты проверки одного и того же препарата, сделанные с помощью реактивов разной чувствительности, не противоречат друг другу.

Принимая во внимание все вышесказанное, можно рекомендовать при составлении СОПов и иных нормативных документов использовать значения реальной чувствительности ЛАЛ-реактива (для реактивов 0,03 ЕЭ/мл и 0,06 ЕЭ/мл). Это более правильный и последовательный подход. Следуя правилам математики, округлять, если это необходимо, следует получившийся результат, а не исходные цифры.

В заключении хочется вернуться к вопросу о выборе чувствительности ЛАЛ-реактива. Резюмируя все выше сказанное, можно заключить, что выбор ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл представляется самым оптимальным и наиболее обоснованным. Хотя, представляется, что сегодня на выбор большее воздействие оказывают не потребительские свойства самого реактива, а ограниченное пока еще использование метода и, как следствие этого, ограниченное предложение со стороны поставщиков. Действительно, если лаборатория проводит 2-3 анализа в месяц, держать парк реактивов с разной чувствительностью не имеет смысла. Если на производстве один человек занимается проверкой ГЛС, внутрипроизводственным контролем, заказом реактивов, составлением операционных инструкций и т.д., то сомнительно, что ему захочется усложнять

себе работу еще и расширением ассортимента используемых реактивов, ведением их учета и проверкой чувствительности. У поставщиков реактивов тоже есть свои аргументы в пользу реактива одной чувствительности.

Нельзя не учитывать также и то обстоятельство, что у нас практически не используются инструментальные методы. Хромогенный и турбидиметрический методы проведения анализа позволяют точно определить содержание эндотоксинов, в том числе и очень низкие концентрации. В отсутствие этих методов обязанность точного определения низких концентраций эндотоксина тоже выполняет реактив 0,03 ЕЭ/мл. В настоящее время с использованием ЛАЛ-реактива 0,03 ЕЭ/мл проводят и внутрипроизводственный контроль, и контроль готовых форм, и научные исследования.

Такое положение дел не может продолжаться вечно. Уже сегодня к инструментальным методам анализа проявляют интерес многие фармацевтические производства и контрольные лаборатории. Можно ожидать, что в самом ближайшем будущем эти методы станут активно использоваться, постепенно заменяя и вытесняя гель-тромб тест. Конечно, полного отказа от гель-тромб теста не произойдет. Даже в Европе и Америке с его помощью проводятся до 60-70% всех анализов. Зато с расширением круга работающих с методом неизбежно будет расширяться и спектр используемых реактивов. Возможно, и дальше ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл будет наиболее популярным, но совершенно очевидно, что не будет одним единственным из востребованных.

LAL label claim sensitivity and its use in calculations. LAL Update 1994 Vol 12., No. 4., P.3.

Cooper J.F. // Rounding BET related calculations. Regulatory review for the Bacterial Endotoxin Test. 2001. P.6.

Значение pH испытуемого образца и реакционной смеси.

Ситников. А. Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №3 (14) 2006

Реакция ЛАЛ-реактива с эндотоксином, как и любая другая ферментативная реакция, зависит от ряда параметров, среди которых не последнюю роль играет и значение pH реакционной смеси. Не случайно во всех общих статьях «Бактериальные эндотоксины» вопрос значения pH так или иначе оговаривается. В частности, в отечественной ОФС приведена следующая формулировка:

«...Испытуемый раствор должен иметь рН в пределах, указанных производителем ЛАЛ-реактива, обычно 6,0-8,0. В случае необходимости рН доводят растворами кислоты, основания или с помощью буферного раствора...».

В Европейской Фармакопее в разделе «Подготовка испытуемых растворов» приводятся следующие указания: *«... В случае необходимости доведите значение рН испытуемого раствора (или его разведения) так, чтобы значение рН реакционной смеси, состоящей из лизата и испытуемого раствора, находилось в ряду значений, определенных производителем ЛАЛ-реактива. Обычно значение рН испытуемого раствора должно быть в ряду 6,0 - 8,0...».*

При некоторой разнице формулировок смысл их абсолютно одинаков. Эти короткие абзацы можно рассматривать как напоминание или рекомендацию: рН нужно контролировать. Можно проверять значение рН только испытуемого раствора, а не реакционной смеси. Вилка в две единицы рН считается приемлемой. Подробности и детализацию следует искать в инструкциях к ЛАЛ-реактиву. Особенно важно то, что нет никаких директивных указаний на необходимость проверки рН перед каждым конкретным опытом.

Этот небольшой абзац о рН претерпевал интересные эволюции и отличался в разных редакциях различных Фармакопей. В самой первой общей фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» (ВЕТ <85>, USP XX, 1980) указывалось, что рН испытуемого образца должен быть в пределах 6,0 - 7,5.

В первых редакциях Европейской Фармакопеи (Bacterial Endotoxins 12.6.4, 1993) окно значений рН для испытуемого образца было еще уже - 6,5 - 7,5 единиц рН. В одной из редакций статьи Фармакопеи США появилось указание на то, что реакционная смесь должна быть в пределах 6,0 - 8,0 (ВЕТ <85>, USP XXIII, 1995). Легко заметить, что на фоне прошлых редакций действующие рекомендации смотрятся и либеральнее, и логичнее.

Перед тем, как перейти к подробному рассмотрению вопросов, связанных с введением рН перед анализом, следует обратить внимание на различие понятий «испытуемый раствор» и «реакционная смесь». В контексте фармакопейных статей испытуемым раствором может быть назван препарат или его разведения, причем то разведение, которое ставится в опыт, и этих разведений может быть несколько, например, в количественном анализе. Реакционная смесь - это всегда испытуемый раствор и ЛАЛ-реактив в отношении 1:1.

Важно, чтобы оптимальным был рН реакционной смеси, поскольку именно в ней и

проходит реакция. Кстати, оптимальная активация ферментов каскада коагуляции ЛАЛ-реактива происходит при значении рН $7,3 \pm 0,5$. Но измерение рН реакционной смеси представляет собой техническую проблему. Объем реакционной смеси очень маленький, всего 0,2 мл. Этому объему соответствует и диаметр пробирок для реакции 10мм. Диаметр штатного электрода лабораторного рН-метра обычно 10-12 мм. Следовательно, обычным электродом измерить рН реакционной смеси нельзя. Нужен специальный, тонкий электрод, позволяющий проводить измерения в малых объемах. Такие электроды, особенно микроэлектроды, очень деликатные и хрупкое оборудование, да и стоят они иногда больше самого рН-метра. И еще очень жалко реакционную смесь, точнее ЛАЛ-реактив. После измерения проводить реакцию уже не имеет никакого смысла. На результат реакции неизбежно повлияют манипуляции с электродом. В общем, рекомендация контролировать рН реакционной смеси - это проблема для аналитика, проводящего анализ. Другое дело, испытуемый раствор, при некоторой изобретательности можно измерить его рН даже обычным электродом в обычной посуде. Да и воду для ЛАЛ-теста в этом случае вполне можно заменить обычной дистиллированной водой. Такое измерение является привычной аналитической операцией, более того, эту процедуру совсем необязательно привязывать к конкретному анализу. Измерение можно проводить параллельно или отдельно от опыта.

Нельзя не учитывать тот факт, что рН испытуемого раствора может оказывать влияние на результат реакции. Экстремальные значения рН могут приводить к тому, что реакция даже в присутствии эндотоксинов не идет, что в рамках принятых определений трактуется как ингибирование реакции. Очевидно, что истинным ингибированием ферментативной реакции влияние рН называть неправильно. Возможно, именно поэтому сначала в Европейской Фармакопее, а сейчас и во всех Гармонизированных статьях довольно конкретное и описательное определение «ингибирование/усиление» реакции было заменено на аморфное название «мешающие факторы». Правда, до сих пор в ситуации, если ферментативная реакция не идет, когда она по всем показаниям идти должна, говорят о ее ингибировании. Так этот термин и соответствовал в течение многих лет разным «ингибиторам»: рН, высокой ионной силе растворов и т.д. Формулировки важны, но и «ингибирование», и «мешающие факторы» в данном случае не идеальны, и традиционно используются оба определения, смысл которых обычно понятен из контекста высказывания.

Поскольку неоптимальные значения рН могут мешать реакции, в определенных случаях возникает необходимость в

коррекции pH. Для этой цели предназначен целый арсенал средств.

Начать стоит с буферных растворов. Для подготовки к проведению анализа используются вполне обычные буферные растворы: Трис-HCl буфер или фосфатный буфер. Общие требования к ним примерно такие же, как и к воде для ЛАЛ-теста: отсутствие эндотоксинов в определяемых в тесте количествах и отсутствие факторов, мешающих реакции. Так же как и воду для ЛАЛ-теста, эти растворы делают все компании-производители ЛАЛ-реактива и проверяют готовые серии на соответствие вышеупомянутым требованиям. Буферный раствор можно приготовить самостоятельно, но его необходимо проверить перед постановкой опыта. Раствор не должен быть очень концентрированным, поскольку высокая концентрация солей может быть фактором ингибирования реакции, тем самым мешающим фактором. Обычно используются растворы 0,1 М Трис-буфера или фосфатного буфера. Эти растворы могут применяться вместо воды для ЛАЛ-теста при подготовке разведения испытуемого препарата. По-видимому, необходимо использовать буфер для подготовки всех разведений, от начала до конца. Соответственно, для проверки чистоты растворителя буферный раствор следует ставить и в качестве отрицательного контроля. Есть варианты подготовки испытуемых растворов, в которых для препаратов с сильным сдвигом pH в кислую или щелочную сторону используется 0,25М Трис буфер. В данном случае с помощью этого буферного раствора делаются первые несколько разведений для приведения pH к норме, затем разведения продолжают водой, разбавляя буфер и уходя от опасности ингибирования, связанного с его высокой концентрацией.

Интересно отметить, что иногда буферный раствор может оказаться средством преодоления ингибирования, которое напрямую не связано с pH. Например, разведенный в воде препарат ингибирует реакцию, а этот же препарат, разведенный буфером, не ингибирует. При этом значение pH и в том, и в другом случае находится в рамках нормы.

В редких случаях на первом этапе коррекции pH используются растворы кислоты или основания (обычно это 0,1 М растворы HCl и NaOH). Как правило, это даже не разведение, а добавление небольшого количества концентрированного раствора кислоты или щелочи для того, чтобы сразу сдвинуть pH в нужную сторону. Далее продолжают разведения водой или буфером до желаемой степени разведения. Растворы кислоты или щелочи чисто теоретически должны быть проверены на отсутствие эндотоксинов. Но целесообразность этого

мероприятия, также как и его выполнимость представляют большой вопрос.

Все действия по подготовке испытуемого препарата, такие как использование специальных растворов для доведения pH, должны проходить предварительную проверку и должны быть валидированы. Не требует валидации только процедура пробоподготовки, предполагающая разведение испытуемого препарата водой для ЛАЛ-теста. И в большинстве случаев именно разведение водой оказывается вполне достаточно для приведения pH испытуемого раствора к норме. По мере разведения препарата водой значение pH испытуемого раствора приближается к значению pH растворителя – воды.

Все перечисленные способы являются способами коррекции pH испытуемого раствора. Когда речь заходит о реакционной смеси, необходимо принимать во внимание еще одну важную и подчас неизвестную величину - буферную емкость ЛАЛ-реактива. Причем в данном случае свойства реактивов разных производителей могут сильно отличаться. Естественный, нативный лизат амебоцитов сам по себе обладает буферной емкостью. Некоторые производители считают, что этого вполне достаточно и не вводят в состав готового реактива буфер. Другие, напротив, стремятся к значительному увеличению буферной емкости реактива, специально изменяя для этого его состав. Что лучше, сказать сложно. С точки зрения пользователя представляется, что лучше работать с забуференным реактивом. Это позволяет меньше внимания уделять pH. Впрочем, есть и специальный буфер - растворитель для ЛАЛ-реактива. Если возникает необходимость, ЛАЛ-реактив может быть разведен буфером.

Примечание. Следует внимательно относиться к информации, приведенной в инструкции к ЛАЛ-реактиву. Не все реактивы можно разводить буферным раствором. В тоже время эта операция может быть необходима при проведении анализа турбидиметрическим или хромогенным методами. В том случае, если использование буфера желательно или необходимо, это указывается в инструкции к реактиву.

Тем не менее, ЛАЛ-реактив с хорошей буферной емкостью значительно упрощает работу. В большинстве случаев такой реактив в комбинации с неизбежным разведением препарата водой позволяет обойтись без коррекции pH, даже если в проверяемом разведении испытуемого препарата значение pH далеко от оптимального. Следует помнить, что буферная емкость у ЛАЛ-реактивов разных производителей различная. Поэтому в случае перехода на ЛАЛ-реактив другого производителя значение степени разведения, в котором пропадает ингибирование, может измениться.

Таким образом, буферная емкость ЛАЛ-реактива может оказаться достаточной для коррекции рН. Как правило, препараты с кислой или щелочной реакциями вводятся в малых объемах, поэтому для них допустимы высокие значения предельного содержания эндотоксинов и, соответственно, предполагаются высокие значения МДР. В процессе разведения препарата происходит выравнивание значения рН, которое может войти в норму, а если этого не случается, то концентрация ионов оказывается настолько мала, что она легко компенсируется буферной емкостью ЛАЛ-реактива. Для растворов, вводимых в больших объемах, с малыми значениями МДР, характерны либо физиологическое значение рН, либо ситуация, аналогичная описанной выше. Т.е. значение рН за рамками, но ионов очень мало, и их избыток легко компенсируется ЛАЛ-реактивом. Именно поэтому практически во всех инструкциях к ЛАЛ-реактиву указано, что не следует доводить рН растворов с малой ионной силой. Также как не следует при проверке воды для инъекций доводить ее рН, даже если она имеет кислую реакцию.

В целом, складывается интересная ситуация. Значение рН вроде бы важно, но на практике, как правило, ни доводить, ни проверять его не надо, поскольку это значение выравнивается до нормы при разведении водой, или его можно просто игнорировать в виду низкой ионной силы проверяемых растворов. В тоже время, во всех Фармакопеях упоминается о важности фактора рН. Как поступать на практике?

Все достаточно просто. Анализ «Бактериальные эндотоксины» при включении в ФСП (НД) должен быть валидирован. Как раз на стадии валидации метода и выясняется: в какой степени рН препарата влияет на результат реакции. Практическая проверка на ингибирование проводится для разных разведений препарата. Параллельно для этих разведений проверяется и значение рН. Данные по изменению профиля рН при разведении испытуемого препарата хранят вместе с другими валидационными протоколами. Как правило, эти данные являются справочными, поскольку довольно редко можно встретить ситуацию, в которой ингибирование пропадает именно в том разведении, в котором рН входит в оговоренные рамки. Чаще прямой связи установить не удается. Если в процессе подготовки к анализу «Мешающие факторы» выясняется, что причиной ингибирования может оказаться рН, отработывается и способ коррекции этого значения. Соответственно, процедура пробоподготовки тоже включается в валидационные протоколы и может быть включена в текст ФСП. На заключительной стадии валидации процедура контрольного анализа оформляется в виде СОПа. В тексте этого СОПа можно прямо указать: необходима

или нет проверка рН в процессе пробоподготовки.

В ситуации, когда необходимо провести контрольный анализ, и нет никаких данных по тому, как следует готовить препарат, можно ориентироваться на результаты положительного контроля испытуемого образца. Если в этом контроле испытуемого образца получен положительный результат – препарат не ингибирует реакцию, и вопрос о рН снимается сам собой. Если в положительном контроле испытуемого образца получен отрицательный результат, это означает, что препарат ингибирует реакцию, следует увеличить степень разведения и измерить рН проверяемого раствора. Возможно, в этом случае ингибирование является следствием рН испытуемого раствора. Таким образом, при проведении рутинных анализов имеет смысл измерять значение рН в ситуациях, когда образец ингибирует реакцию. И совсем не обязательно выбирать степень разведения препарата для анализа только по признаку нормального значения рН для этого разведения.

В заключении хочется вернуться к началу - фармакопейным рекомендациям. Как их надо понимать и в какой степени им следовать.

1. Значение рН в принципе может влиять на результат анализа, негативное влияние выражается в виде ингибирования реакции.

2. На практический результат опыта большое влияние может оказать состав ЛАЛ-реактива и его буферная емкость.

3. Приведенные в ОФС указания относительно рН не означают, что перед каждым анализом следует проверять рН испытуемого раствора.

4. Данные о влиянии/не влиянии рН на ход реакции должны быть получены на стадии валидации метода и должны быть включены в валидационные протоколы. Процедура пробоподготовки должна быть отражена в СОПах.

Факторы, мешающие реакции. Проблемные образцы.

Ситников А. Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №4 (19) 2007

На сегодняшний день технология проведения ЛАЛ-теста настолько хорошо отработана и опробована, а вариантов различной пробоподготовки предложено такое количество, что уже почти аксиомой стало утверждение «с помощью ЛАЛ-теста можно проверить практически любой лекарственный препарат». Однако в ряде случаев проведение такой проверки может представлять собой определенные проблемы.

Понимание этих проблем может быть значительно облегчено, если сначала рассмотреть ту теоретическую модель, на которой построена проверка содержания эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста. Модель эта основана на реакции ЛАЛ-реактива с эталонным стандартом эндотоксина, растворенным в воде. Т.е. в чистом виде это реакция, в которой участвуют только ЛАЛ-реактив и эндотоксин. Состав ЛАЛ-реактива оптимизирован, т.е. в него введены катионы, являющиеся кофакторами реакции, реактив может быть забуферен и т.д. Эндотоксин представляет собой высокоочищенный препарат, липополисахарид грамотрицательных бактерий, причем конкретного штамма. В качестве растворителя для эндотоксина используется вода для ЛАЛ-теста. Таким образом, в реакционной смеси присутствуют два компонента: ЛАЛ и КСЭ, при этом ЛАЛ - это сложная смесь белков и различных солей. Реакция идет в оптимальных для нее условиях: значение pH, оптимальный баланс солей. Поведение этой системы предсказуемо, соответственно, вполне предсказуемы и результаты, которые при нормально поставленной технике эксперимента имеют достаточно высокую точность, гораздо более высокую, чем заявленный диапазон ошибки опыта в 50-200%. В общем, работа с очищенным эндотоксином демонстрирует идеальное совпадение теоретических расчетов и практических результатов.

Когда же эту аналитическую модель применяют к испытуемому лекарственному средству, от идеальной модели остается только ЛАЛ-реактив. Вместо чистой воды сложная смесь активных и вспомогательных веществ, наполнителей и т.д. Если же в препарате присутствуют эндотоксины, то это не высокоочищенный КСЭ, а случайные примеси «естественных эндотоксинов» неизвестного происхождения (уж точно не от одного штамма грамотрицательных бактерий). Все это может влиять на сложную биохимию реакции ферментативных белков лизата или на поведение молекул эндотоксина и привносить проблемы, которые приходится решать отдельно для каждого конкретного лекарственного средства. Сегодня, описывая эти проблемы, наиболее часто используют определение «Мешающие факторы». Этот термин принят всеми Фармакопейными статьями. И хотя данное определение очень аморфно, в эту группу без терминологических метаний может быть отнесено все, что не дает нормально работать, в том числе и pH, и плохая растворимость проверяемого препарата, и неудобная для проведения анализа форма выпуска, например, в виде масляного раствора.

Довольно сложным делом оказывается определение причин, усложняющих процедуру определения эндотоксина в том или ином лекарственном препарате.

Традиционно считается, что наиболее удачная классификация этих причин приведена Джеймсом Купером (Cooper J F). Он приводит следующие группы проблем, которые вызывают как ингибирование, так и усиление реакции:

- Неоптимальное значение pH.
- Агрегация или адсорбция эндотоксинов.
- Неоптимальная концентрация катионов.
- Воздействие на ферменты и белки коагуляционной системы.
- Неспецифическая активация ЛАЛ-реактива.

Имеет смысл рассмотреть эти позиции более подробно.

Неоптимальное значение pH - это наиболее частая причина «ингибирования» реакции, она же наиболее легко решаемая. Вопрос влияния значения pH испытуемого образца на реакцию мы разбирали в одном из последних номеров («ЛАЛ-тест» №3, 2006), поэтому подробно этой теме касаться не имеет смысла. Единственное, что хотелось бы отметить еще раз: лучшим способом решения проблемы pH является разведение водой для ЛАЛ-теста. В случае явной необходимости коррекции pH, в первую очередь, следует использовать буферные растворы для разведения препарата. С осторожностью надо подходить к доведению pH с помощью растворов кислоты или основания.

Агрегация или адсорбция эндотоксинов. Эндотоксины или липополисахариды, ЛПС, это сложные молекулы, одновременно проявляющие гидрофильные и гидрофобные свойства, они не образуют истинных растворов, а в разных средах формируют сложные агрегаты различной формы и размера. Биологическая активность ЛПС зависит от размеров этих агрегатов. Катионы, находящиеся в растворе, оказывают большое значение на статус эндотоксина в растворе. Так, двухвалентные катионы, такие как Mg^{2+} Mn^{2+} или Ca^{2+} нейтрализуют отрицательный заряд ЛПС и являются центрами, вокруг которых образуются крупные агрегаты ЛПС. Это в принципе неплохо, но очень крупные агрегаты замедляют реакцию, во всяком случае, она идет не так, как в модельной среде «ЛАЛ + эндотоксин в воде». Другая сторона вопроса - это адсорбция ЛПС на поверхности контейнеров. В результате этой адсорбции молекулы эндотоксина «выходят из игры» и не приводят к гелированию ЛАЛ-реактива. Именно поэтому в анализе из-за высокой степени адсорбции не используется пластиковая посуда.

К этому перечню причин получения ложноотрицательных результатов можно добавить еще одну. Долгое хранение подготовленных растворов положительного контроля крайне нежелательно. Очищенный липополисахарид значительно менее стабилен

по сравнению с «естественными» эндотоксинами. Поэтому КСЭ в растворе может быстро разрушаться, что приводит к получению отрицательных результатов в положительных контролях.

Неоптимальная концентрация катионов подразумевает недостаток или избыток двухвалентных катионов, которые являются кофакторами реакции. Это упомянутые выше Mn^{2+} , Ca^{2+} и особенно Mg^{2+} . Эти катионы добавляют в ЛАЛ-реактив в процессе его производства, что приводит к значительному увеличению его чувствительности.

Поэтому проверка препаратов, обладающих хелатирующим действием, таких как гепарин, ЭДТА или цитрат натрия, может давать ложные результаты из-за снижения активной концентрации этих ионов в реакционной смеси. Это может приводить к потере активности ферментной системы (как вследствие изменения конформации ЛПС, так и вследствие снижения активности белков лизата). Решением проблемы может быть разведение испытуемого препарата. Альтернативный вариант, предлагаемый многими производителями ЛАЛ-реактива, - добавление специальных растворов, содержащих ионы Mg^{2+} , для компенсации недостатка катионов.

Если катионов слишком много, это тоже плохо, например, Ca^{2+} может серьезно ингибировать реакцию в высоких концентрациях (6-50 мМ). Подход к разрешению этой проблемы довольно курьезный. Конечно, и в этом случае лучшим решением оказывается дежурный вариант: разведение препарата до концентрации $CaCl_2$ примерно 1-2 мМ. Однако, наиболее интересен другой вариант решения этой проблемы: добавление веществ, обладающих хелатирующим действием, например, ЭДТА.

Можно отметить, что в отличие от ионов Ca^{2+} избыток ионов Mg^{2+} не приводит к ингибированию реакции.

Воздействие на ферменты ЛАЛ-реактива. В группу веществ, которые воздействуют на ферменты лизата, могут быть отнесены вещества, оказывающие непосредственное деструктивное воздействие на ферментативные белки ЛАЛ-реактива, например, органические растворители. Также в эту группу, без всякого сомнения, могут быть отнесены и ингибиторы свертывания, воздействующие на сериновые протеазы ЛАЛ-реактива. Поэтому определенные сложности могут возникнуть при проверке плазмы или сыворотки, в которых могут содержаться естественные ингибиторы свертывания, оказывающие на систему свертывания ЛАЛ-реактива такое же действие, как и на систему свертывания человека. Наиболее распространенный способ устранения этих явлений: разведение и нагревание образцов плазмы для денатурации факторов, которые

могут оказывать нежелательное воздействие на реакцию.

Неспецифическая активация ферментов ЛАЛ-реактива - это активация ферментной системы под действием веществ, отличных от эндотоксинов. Такая неспецифическая активация приводит к получению положительного результата в отсутствие эндотоксинов. Ложноположительные результаты могут вызывать фрагменты полисахаридного матрикса клеточных стенок грамположительных бактерий, (1 \rightarrow 3)- β -D-гликаны. Основной сложностью в ситуации неспецифического гелирования является то, что такие результаты очень трудно правильно интерпретировать. Положительные результаты воспринимаются как свидетельство присутствия эндотоксина с соответствующими выводами. В том случае, если есть подозрение, что положительные результаты вызваны присутствием в проверяемом образце β -гликанов, можно использовать специальные препараты, которые снимают их действие.

Следует отметить, что большая часть перечисленных проблем приводит к тому, что обычно называют ингибированием реакции. И пусть это не очень точный термин, явление ингибирования (торможения, блокирования реакции, денатурации белков лизата и т.д.) встречается очень часто и представляет наибольшую опасность, поскольку в случае неверной интерпретации результатов возможен выпуск в реализацию препаратов, потенциально опасных для человека.

Классификация, приведенная Купером, считается одной из наиболее удачных, однако и она не может быть признана абсолютно исчерпывающей. Так к перечисленному списку позже был добавлен еще один пункт, к которому были отнесены белковые препараты, способные маскировать присутствие эндотоксинов. Вполне вероятно, что и в дальнейшем этот список будет расширяться.

Вообще, приходится констатировать, что очень сложно сформулировать стройную систему классификации по единообразной системе определений. Можно попытаться провести разделение не по причинам, вызывающим сложности при проверке, а по группам веществ, эти проблемы вызывающих. Такая классификация возможно даже более информативна, поскольку она описывает не природу ингибирования/усиления в общем виде, а несколько более конкретно определяет, какие группы веществ (препаратов) или какие свойства этих препаратов способны вызвать затруднения при проверке. Часто в литературе можно встретить и соответствующее определение «проблемные препараты». К этой группе можно отнести любой препарат или активную субстанцию, проверка которых сопряжена с трудностями. Есть группы препаратов,

которые можно было бы назвать проблемными не столько из-за их влияния на реакцию, сколько из-за сложности их предварительной подготовки к проведению анализа. К таким проблемным препаратам можно отнести:

- Белки.
- Органические растворители.
- Поверхностно-активные вещества.
- Нерастворимые вещества (препараты или субстанции).
- Масла или масляные растворы.
- Препараты с высокой концентрацией ионов.
- Препараты, обладающие хелатирующим действием.

Несложно заметить, что данная классификация отчасти повторяет пункты, приведенные выше. Разница в том, что сгруппированные таким образом вещества или препараты предполагают относительно унитарные способы решения вызываемых ими проблем. Так, например, подходы к пробоподготовке препаратов, выпускаемых в виде масляных растворов, могут быть одинаковыми вне зависимости от характера активного вещества, растворенного в масле. Алгоритм решения вопросов возможности применения органических растворителей вне зависимости от характера растворяемых с их помощью субстанций или готовых форм может быть более или менее одинаковым. Уже одно понимание того, что активная субстанция может связывать катионы, позволяет еще до начала исследований подобрать наиболее приемлемую стратегию пробоподготовки. Логическим следствием такой группировки должна быть

систематизация информации по приемлемым способам предварительной обработки, вариантам пробоподготовки для каждой из упомянутых групп. Такой банк данных по разным стратегиям проведения анализа может быть очень полезным в практической работе.

Заключение

Любая классификация, даже самая совершенная, представляет только академический интерес, если она лишь заявляет о проблеме. С практической точки зрения наибольший интерес представляет не раскладывание проблем по полочкам, а работоспособные сценарии разрешения этих проблем. Это, наверное, самое важное. Ведь недостаточно сказать, что практически каждый препарат может быть проверен. Важно знать: как подготовить препарат к проверке, как правильно провести анализ.

Мы полагаем, что эта статья станет началом нового цикла публикаций, которые будут посвящены практическим решениям, связанным со специальными приемами пробоподготовки так называемых «проблемных препаратов».

Литература

Cooper J.F. "Resolving LAL Test interferences." J Parenter Sci Technol 1990 Jan;44(1):13-15

Pearson F.C. "Pyrogens: Endotoxins, LAL testing and depyrogenation." Marcel Dekker Inc. 1985. N.Y.

Williams K.L. "Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation, Third Edition". Informa Healthcare 2007 N.Y

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ АНАЛИЗЫ, ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

ОБЩАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДА

Материалы Семинара «Введение раздела «Бактериальные эндотоксины» в ФСП предприятия. Валидация метода».

ЛАЛ-тест, также как и анализ «Пирогенность», является биологическим методом контроля, и введение его в раздел ФСП требует проведения предварительной валидации метода. У весьма популярного в настоящее время термина «Валидация» есть множество частных определений. Например:

«Валидация заключается в документированном подтверждении соответствия оборудования, условий производства, технологического процесса, качества полупродукта и готового продукта действующим регламентам и/или требованиям нормативной документации.» ОСТ 42-510-98.

«Валидация - документированная процедура, дающая высокую степень уверенности в том, что конкретный процесс, метод или система будет последовательно приводить к результатам, отвечающим заранее установленным критериям приемлемости.» (МУ «ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. ВАЛИДАЦИЯ». МинПромНауки М.2001)

Вполне правомочным может быть и следующее определение, взятое из толкового словаря:

«Утверждение, ратификация; придание законной силы, легализация»

Последнее определение не столь изящно, как два первых, но, возможно, в части валидации анализа оно наиболее понятно. В приложении к ЛАЛ-тесту валидационные процедуры должны убедительно показать, что лекарственный препарат может быть проверен выбранным методом, и результаты рутинных анализов, выполненных по стандартной схеме, будут достоверными. В ОФС «Бактериальные эндотоксины» приведено описание двух анализов, которые можно назвать инструментами валидации. Это анализы «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» и «Мешающие факторы». Однако, в ОФС нет подробного описания плана проведения валидационных процедур. Некоторым утешением может служить тот факт, что эта тема слабо освещена и в зарубежной литературе. Пожалуй, единственный документ, в котором вопросы валидации ЛАЛ-теста рассматриваются комплексно и подробно, - это Руководство FDA по валидации ЛАЛ-теста. Полное название этого документа "Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". В этом руководстве подробно расписаны правила валидации метода и последовательность действий. И, хотя этот старый документ может считаться официальным нормативным документом только для фарминдустрии США, он до сих пор является наиболее востребованным и часто цитируемым документом. Это руководство можно считать стандартом «де факто» и, проводя валидационные мероприятия, можно не только следовать приведенным в нем рекомендациям, но и ссылаться на этот документ.

Еще раз стоит подчеркнуть, что ценность и значимость валидации метода заключается не столько в документировании этой процедуры, что само по себе важно, сколько в практической отработке схемы проведения рутинных анализов, при которой результаты этих анализов могут однозначно считаться достоверными.

Валидация метода - процедура многоуровневая, сочетающая в себе практические эксперименты и теоретические расчеты. Она может быть разделена на два разных по назначению этапа. Первый этап можно назвать общей валидацией метода, на котором подтверждается, что весь измерительный комплекс в целом нормально работает и обеспечивает получение ожидаемых результатов. На этом же этапе подтверждается квалификация экспериментатора, проводящего анализ. Все вышеперечисленные задачи могут быть выполнены с помощью модельного эксперимента, результаты которого могут быть адекватно оценены или должны быть заранее известны. Таким анализом является анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива»

Опыт «Подтверждение заявленной чувствительности» может быть использован для:

- аттестации лаборатории;
- аттестации сотрудников;
- проверки серии ЛАЛ-реактива.

К этому можно добавить еще две задачи (цели). Это аттестация или валидация типовых методик работы (работа с ЛАЛ-реактивом, КСЭ, правила подготовки разведений). Опыт может быть проведен и с целью валидации технологии подготовки вспомогательных материалов или, скорее, с целью оценки качества готового продукта. Этот опыт, пожалуй, - единственный доступный способ убедиться в том, что после цикла обработки материалы, например, вода, «.. не содержат бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте и не оказывают влияния на ход реакции».

Ниже приведена таблица, где все валидационные процедуры представлены списком, и для каждой позиции указаны условия и сроки проведения ревалидации.

Этап валидации/аттестации	Условия повторения
ЛАЛ-реактив, КСЭ, материалы	Новая серия ЛАЛ-реактива и КСЭ, новый поставщик материалов
Аттестация лаборатории	Плановая ревалидация, новое оборудование
Аттестация сотрудников	Плановая переаттестация, новые сотрудники
Типовые методики	Плановая ревалидация, изменения методик
Обработка вспомогательных материалов	Подготовка новой серии, изменение технологии

Практически все валидационные/аттестационные процедуры проводятся один раз и повторяются в соответствии с планом ревалидации, обычно не чаще одного раза в год. Лишь одна задача, занимающая первую строку списка - проверка новой серии ЛАЛ-реактива - выполняется вне всяких временных планов по мере поступления новой серии реактива. На практике это означает, что этот опыт повторяется 3-4 раза в год именно с целью проверки новой партии ЛАЛ-реактива. Все остальные задачи решаются автоматически такое же количество раз. В большинстве случаев решение всех остальных задач, отличных от проверки новой серии ЛАЛ-реактива, сводится только к правильному протоколированию и ведению валидационных архивов.

Резюмировать вышесказанное можно следующим образом. Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» является универсальным средством проверки работоспособности тест-системы и может быть использован при решении валидационных задач первого уровня.

Следующий этап валидации относится уже к каждому конкретному лекарственному препарату. На этом этапе необходимо показать, что препарат может быть проверен выбранным методом. Этот вопрос решается с помощью анализа «Мешающие факторы». По сути, этот анализ очень похож на проверку чувствительности ЛАЛ-реактива. Разница заключается в том, что проверка проводится с помощью стандарта эндотоксина, растворенного в проверяемом препарате, а не в воде для ЛАЛ-теста. Этот анализ проводится для трех разных серий испытуемого препарата.

До начала проведения этих опытов необходимо рассчитать значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов в препарате, которое зависит от его терапевтической дозы. А также определить ту степень разведения ЛС, в которой будет проводиться анализ «Мешающие факторы». Наконец, на заключительной стадии отрабатывается методика проведения рутинных анализов, которая оформляется в виде СОПа.

ЭТАПЫ ВАЛИДАЦИИ

Этап	Название	Назначение	Кол-во серий	Нормативные документы
1	Расчет значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов	Определение безопасной для человека концентрации эндотоксина в лекарственном препарате с учетом его максимальной терапевтической дозы	-	Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата
2	Подтверждение заявленной чувствительности и ЛАЛ-реактива	Валидация основных реактивов *	1	ОФС 42-0002-00
3	Мешающие факторы	Валидация метода для лекарственного препарата	3	ОФС 42-0002-00
4	Качественный анализ	Отработка процедуры проведения контрольных анализов лекарственного препарата	1	ОФС 42-0002-00

**Примечание: В случае введения ЛАЛ-теста впервые в практику контроля на предприятии, анализ используется также для валидации материалов и оборудования, используемых для проведения анализа «Бактериальные эндотоксины» и для аттестации сотрудников.*

Опыт «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», его назначение и место в общей системе контрольных анализов.

Ситников. А. Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №4 (15) 2006

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» занимает особое место в системе контроля по показателю «Бактериальные эндотоксины». С него начинаются все общие фармакопейные тесты. Аналогичная по сути проверка в кинетических анализах называется «Проверка критериев достоверности калибровочной кривой» и проводится несколько иначе.

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» подробно описан в общих статьях «Бактериальные эндотоксины» всех Фармакопей. И, поскольку он разбирается первым из всех опытов, на его примере приводятся объяснения процедуры проведения опытов, правила обработки и интерпретации полученных результатов. Не является исключением и ОФС «Бактериальные эндотоксины», в которой этот анализ также разбирается в первую очередь. А в новой редакции ОФС для большей конкретизации назначения и места этого анализа он наряду с опытом «Мешающие факторы» отнесен в отдельную группу - «Предварительные анализы». Уже само название этой группы подчеркивает, что отнесенные к ней анализы должны быть проведены до начала постановки контрольных опытов.

И хотя в ОФС не используется термин «валидация», группа опытов «Предварительные анализы» является по сути основными валидационными мероприятиями, причем анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» может быть отнесен к общей валидации метода, а анализ «Мешающие факторы» к более частной валидационной процедуре - валидации метода проверки конкретного лекарственного препарата.

вопросы валидации ЛАЛ-теста рассматриваются комплексно и подробно, - это Руководство FDA по валидации ЛАЛ-теста. Полное название этого документа "Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". И, хотя это старый документ, к тому же официальным нормативным документом он может считаться только для фарминдустрии США, это руководство до сих пор является наиболее востребованным и часто цитируемым документом. В этом руководстве довольно подробно расписаны правила валидации метода, причем значительная часть

статьи, ему уделено особое внимание и в инструкциях по применению ЛАЛ-реактива. Это не случайно, потому что значение этого опыта выходит далеко за рамки его собственного названия. Назначению этого анализа, подробному разбору способов его проведения и вариантов, в которых необходимо его повторение, посвящена эта статья.

Сразу надо отметить, что анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» имеет отношение только к

Почему анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» считается первым и главным предварительным анализом? Потому что это наиболее универсальный и простой способ проверки качества ЛАЛ-реактива, и не только ЛАЛ-реактива, но и всей тест-системы в целом. На это прямо указывается в начале раздела «Предварительные анализы» ОФС:

«Для подтверждения достоверности и точности результатов определения бактериальных эндотоксинов, проводимых с помощью ЛАЛ-реактива, необходимо подтвердить чувствительность реактива, указанную на этикетке ...». (Формулировка из новой редакции ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

В этом абзаце недвусмысленно указывается на прямое назначение опыта - проверка, или другими словами, валидация, реактива. В части правил, регламентируемых фармакопейной статьей, этого достаточно. Но если смотреть на систему контроля в целом, становится очевидно, что валидация метода - это не только проверка реактива.

Так получилось, что тема валидации ЛАЛ-теста в разных его модификациях в отечественной нормативной литературе не отражена совершенно. Некоторым утешением может служить тот факт, что эта тема слабо освещена и в зарубежной литературе. Пожалуй, единственный документ, в котором

валидационных задач решается именно с помощью опыта «Подтверждение заявленной чувствительности». Кроме проверки ЛАЛ-реактива с помощью этого опыта можно решить еще, как минимум, две задачи: провести аттестацию работоспособности используемого оборудования (лаборатории) и проверить умение работать конкретного сотрудника. Собственно эти три задачи или этапа: лаборатория-аналитик-реактив и составляют три круга первичной валидации метода.

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» и валидация метода.

Проведение контрольных анализов невозможно без специального лабораторного оборудования и качественных реактивов. Каким образом можно убедиться в том, что все компоненты действительно соответствуют предъявляемым требованиям? Конечно, измерительное оборудование должно быть поверено. В то же время понятно, что поверка дозаторов, бани и пр. не может однозначно гарантировать нормальной работы комплекса в целом. Следовательно, работоспособность такого комплекса необходимо валидировать, что можно сделать только с помощью модельного эксперимента, результаты которого могут быть адекватно оценены или должны быть заранее известны.

Еще один круг валидации/аттестации относится непосредственно к исполнителям. Действительно, как убедиться в том, что сотрудник усвоил правила работы и с оборудованием, и с реактивами и отдает себе отчет в том, что он делает? Ответ тоже очевиден: необходимо дать ему возможность провести такой же модельный опыт, только уже с другой целью - аттестацией специалиста.

В «Руководстве по валидации ЛАЛ-теста» прямо указывается на то, что опыт «Подтверждение заявленной чувствительности» может быть использован для:

- аттестации лаборатории;
- аттестации сотрудников;
- проверки серии ЛАЛ-реактива.

К этому можно добавить еще две задачи (цели). Это аттестация или валидация типовых методик работы (работа с ЛАЛ-реактивом, КСЭ, правила подготовки разведений). Опыт может быть проведен и с целью валидации технологии подготовки вспомогательных материалов или, скорее, с целью оценки качества готового продукта. Этот опыт, пожалуй, единственный доступный способ убедиться в том, что после цикла обработки материалы, например, вода, «.. не содержат бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте и не оказывают влияния на ход реакции».

Получается, что с помощью этого опыта можно решить множество валидационных задач. Ниже приведена таблица, где все валидационные процедуры представлены списком и указаны для каждой позиции условия и сроки проведения ревалидации (Табл 1).

Табл 1. Валидационные процедуры и общие правила их повторения.

Этап валидации/аттестации	Условия повторения
ЛАЛ-реактив, КСЭ, материалы	Новая серия ЛАЛ-реактива и КСЭ, новый поставщик материалов
Аттестация лаборатории	Плановая ревалидация, новое оборудование
Аттестация сотрудников	Плановая переаттестация, новые сотрудники
Типовые методики	Плановая ревалидация, изменения методик
Обработка вспомогательных материалов	Подготовка новой серии, изменение технологии

Стоит обратить внимание на периодичность повторения этих мероприятий. Практически все валидационные/аттестационные процедуры проводятся один раз и повторяются в соответствии с планом ревалидации, обычно не чаще одного раза в год. Лишь одна задача, занимающая первую строку списка, проверка новой серии ЛАЛ-реактива выполняется вне всяких временных планов по мере поступления новой серии реактива. На практике это означает, что этот опыт повторяется 3-4 раза в год именно с целью проверки новой партии ЛАЛ-реактива. Все остальные задачи решаются автоматически такое же количество раз. В большинстве случаев решение всех остальных задач, отличных от проверки новой серии ЛАЛ-реактива, сводится только к правильному протоколированию и ведению валидационных архивов.

Лаборатория, которая собирается ставить ЛАЛ-тест, начинает с подбора и покупки оборудования и реактивов. Предположим, что правила валидации метода новичкам еще неизвестны, но работать они будут, руководствуясь положениями ОФС. А по ОФС новая серия ЛАЛ-реактива должна быть проверена в опыте «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Это и будет самый первый опыт, проведенный на новом оборудовании. Возможно, этот анализ будет и самым первым опытом для аналитика. Подтверждение чувствительности реактива будет означать еще и то, что весь комплекс оборудования, используемого для проведения ЛАЛ-теста, валидирован, а аналитик прошел аттестацию/самоаттестацию. Получается что, даже не зная, как надо проводить валидацию и самоаттестацию, мы осуществляем эти действия и проводим их единственно правильным способом. Продолевая опыт «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива»

с каждой новой серией реактивов, мы проводим эту валидацию много раз. Правила валидации подробно не описаны, и получается, что мы делаем ее неосознанно, подчас не понимая, что мы ее сделали. Но, с другой стороны, мы реально проводим такую валидацию, потому что следуем правилам статьи «Бактериальные эндотоксины», пусть в ней название опыта и не полностью отражает его многофункциональность. Важнее то, что по сути эта валидация оказывается проведенной.

Получается, что для того чтобы отметить факт проведения валидационных процедур, необходимо только правильно запротоколировать результаты работы. Копия протокола этого анализа, как опыта, в котором чувствительность реактива была подтверждена, может храниться в архиве лаборатории вместе с протоколами контрольных анализов. Этот протокол будет актуален до тех пор, пока не кончится проверенная серия реактива. На него можно ссылаться в протоколах рутинных анализов, указывая в них не только номера серий ЛАЛ-реактива и КСЭ, но и номер и дату анализа, в котором они были проверены. Другая копия протокола может храниться в архиве валидационных протоколов лаборатории вместе со свидетельствами о поверке оборудования и его установочной квалификации. Аналогичным образом может быть отмечен и факт аттестации сотрудника.

Резюмировать вышесказанное можно следующим образом. Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» является универсальным средством проверки работоспособности тест-системы и может быть использован при решении валидационных задач разного уровня. Поэтому этот анализ подробно описан в фармакопейных статьях и в инструкциях на ЛАЛ-реактив. Примечательно, что при значительной разнице в текстах инструкций различных производителей ЛАЛ-реактива в той части инструкций, которая относится к анализу «Подтверждение заявленной чувствительности», они почти идентичны. Учитывая важность этого опыта, имеет смысл подробно рассмотреть рекомендуемую схему его постановки, правила подготовки растворов КСЭ, а также правила интерпретации результатов.

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» в ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Схема проведения этого опыта в старой и новой редакциях ОФС «Бактериальные эндотоксины» примерно одинакова (Рис. 1).

Рис 1. Схема проведения опыта в новой редакции ОФС

Схема эксперимента «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива»

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе	Количество повторностей
С	Раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с концентрацией КСЭ - 2λ	Вода для ЛАЛ-теста	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
D	Вода для ЛАЛ-теста	-	-	-	2

По сравнению с ОФС 42-0002-00 эта схема принципиальных изменений не претерпела, за исключением замены индексов, используемых для обозначений растворов. В новой редакции растворы КСЭ идут под индексом «С», а вода для ЛАЛ-теста под индексом «D». Это связано с тем, что далее в тексте статьи во всех схемах опытов отрицательный контроль (вода для ЛАЛ-теста) - это растворы D, а положительный контроль (т.е. растворы КСЭ) везде идут под индексом С.

Способ подготовки отрицательного контроля вопросов обычно не вызывает. Несколько сложнее дело обстоит с серией растворов КСЭ, которая используется для проверки чувствительности ЛАЛ-реактива. Начать стоит с колонки «Исходный раствор». В данном контексте это раствор КСЭ с концентрацией, равной 2λ, где λ (лямбда) - чувствительность ЛАЛ-реактива в ЕЭ/мл. Далее этот исходный раствор КСЭ разводят, при этом значение разведения указано в колонке «Фактор разведения». Растворителем является вода для ЛАЛ-теста. В опыте ставят четыре разные концентрации исходного раствора КСЭ: от неразведенного с концентрацией 2λ (фактор разведения - 1) до разведенного с концентрацией 0,25λ (фактор разведения - 8). Каждый из этих растворов испытывается в четырех повторностях, и конечный объем каждого из этих растворов должен быть не менее 0,5 мл. В целом, эта схема значительно проще выглядит в виде таблицы, которую заполняют по результатам опыта (Табл. 2).

В статье подробно описаны условия достоверности опыта и правила интерпретации результатов.

Результаты и интерпретация.

Анализ считают достоверным в том случае, если:

- для раствора D (отрицательный контроль) во всех повторностях получены отрицательные результаты,

- для раствора С с концентрацией 0,25λ получены отрицательные результаты.

Конечной точкой реакции для каждой из повторностей растворов С является положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрации КСЭ. По этим результатам рассчитывается среднее

геометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива по следующей формуле:

$$\frac{\text{Среднее геометрическое значение концентраций КСЭ в конечной точке реакции}}{= \text{antilog}} \frac{\sum e}{f}$$

где $\sum e$ – сумма логарифмов концентраций КСЭ в конечной точке реакции в каждой из повторностей, f – число повторностей.

Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной и используется в дальнейших расчетах в том случае, если полученное в эксперименте значение чувствительности ЛАЛ-реактива не менее 0,5λ и не более 2λ.

Эти положения имеет смысл разобрать более подробно, тем более что некоторые из них иногда вызывают вопросы.

С отрицательным контролем все понятно, он должен быть отрицательным, если нет, то опыт недействителен.

Для того чтобы понять, почему для концентрации 0,25λ должны быть получены отрицательные результаты, и зачем надо ставить в опыт концентрацию КСЭ, которая на первый взгляд только дублирует отрицательный контроль, необходимо обратиться к приведенному абзацу, где оговариваются возможные варианты результатов. Приемлемые результаты находятся в диапазоне от 2λ до 0,5λ. Для уверенности в том, что по результатам опыта чувствительность действительно равна 0,5λ, необходимо поставить в тест КСЭ с концентрацией 0,25λ. В противном случае невозможно будет говорить о конечной точке реакции. Т.к. частное определение конечной точки реакции при количественном анализе – это «положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрацией КСЭ». Это определение предполагает, что в ряду разведений КСЭ есть, как минимум, одна концентрация КСЭ, для которой получен отрицательный результат. Если в ряду разведений для всех концентраций получены положительные результаты, конечная точка не определена. Что будет, если исключить из схемы опыта одну точку (0,25λ), можно проиллюстрировать на следующих примерах (Табл. 2 и 3).

Табл.2. Таблица результатов анализа, проведенного по стандартной схеме.

	2λ	λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+	+	-	-
2	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	
4	+	+	+	-	

Конечная точка реакции определена для каждой из повторностей, она равна 0,5λ. Чувствительность реактива, определенная в опыте, соответствует приемлемым критериям.

Табл.3. Таблица результатов анализа, проведенного по «укороченной» схеме.

	2λ	λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+	+	н/о	-
2	+	+	+	н/о	-
3	+	+	+	н/о	
4	+	+	+	н/о	

Способность ЛАЛ-реактива реагировать с КСЭ с концентрацией 0,25λ не определялась. Экономия составила 0,4 мл ЛАЛ-реактива. По результатам анализа конечная точка не определена. Можно только говорить о том, что чувствительность равна или больше 0,25λ. А насколько «больше» - неизвестно. Результаты отрицательного контроля свидетельствуют только о том, что растворитель (вода для ЛАЛ-теста) и посуда не содержат эндотоксинов, но этого недостаточно для того, чтобы принять решение о соответствии/не соответствии ЛАЛ-реактива заявленной чувствительности. В итоге опыт придется переставлять по полной схеме.

Иногда возникает вопрос: почему серия концентраций КСЭ не раздвигается и в большую сторону, т.е. до концентрации 4λ? Ответ напрашивается сам собой. Если при 2λ получен отрицательный результат, то чувствительность реактива точно будет более чем вдвое ниже заявленной, а будет ли она равна 4λ - уже неважно. В данном случае поиски конечной точки не нужны. Иногда в инструкциях к ЛАЛ-реактиву в части, описывающей этот анализ, можно встретить КСЭ в концентрации 4λ. Чем руководствовались авторы таких инструкций, совершенно непонятно.

Теперь стоит перейти к той части обработки результатов анализа, которая вызывает наибольшие проблемы. Это расчеты чувствительности ЛАЛ-реактива, определенной в опыте. Рассчитываться должно среднее геометрическое значение, и в статье приведена формула расчета. На первый взгляд сложно и непонятно. Но, если разобраться, все не так уж и сложно. Во-первых, если во всех повторностях получены одинаковые значения, ничего усреднять не нужно, и это значение принимается за результат опыта. Среднее геометрическое значение рассчитывается только в том случае, когда для разных повторностей получены разные результаты. Зачем нужна математика? Понять целесообразность такой обработки данных можно, если сравнить калибровочные кривые, построенные по стандартному ряду концентраций КСЭ и по логарифмам этих значений (Рис. 2 и 3).

Несложно заметить, что во втором случае получается четкая линейная зависимость, все точки располагаются на одной прямой и с равными интервалами. Соответственно, и промежуточные значения могут быть

определены с большей точностью. Однако для этого промежуточные значения надо сначала перевести в логарифмы, рассчитать их среднее значение, и потом полученную цифру перевести в более понятное значение концентрации КСЭ в ЕЭ/мл, т.е. совершить действие, обратное логарифмированию - определить антилогарифм среднего значения.

Рис. 2. Калибровочная кривая, построенная для стандартного ряда разведений КСЭ с концентрацией от 1,0 ЕЭ/мл до 0,015 ЕЭ/мл

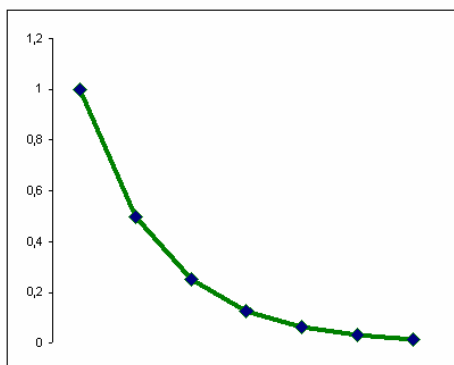
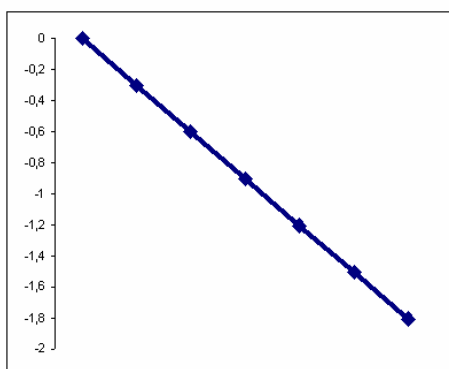


Рис. 3. Калибровочная кривая, построенная по логарифмам значений концентраций КСЭ от 1,0 ЕЭ/мл до 0,015 ЕЭ/мл.



Впрочем, если отвлечься от математики и перейти к арифметике, т.е. к расчету среднего арифметического значения, то результат будет «грубым», но он не очень сильно будет отличаться от «идеального» (Табл. 4).

Табл. 4. Разные варианты обработки результатов опыта (для ЛАЛ-реактива с $\lambda = 0,03$ ЕЭ/мл, концентрации КСЭ указаны в ЕЭ/мл)

	0,06	0,03	0,015	0,0075	Конечная точка
1	+	+	+	-	0,015
2	+	+	-	-	0,03
3	+	-	-	-	0,06
4	+	-	-	-	0,06

Среднее геометрическое значение - 0,035 ЕЭ/мл.
Среднее арифметическое значение - 0,041 ЕЭ/мл.

Если учесть, что для реактива с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл допустимыми могут быть значения от 0,015 ЕЭ/мл до 0,06 ЕЭ/мл, то «неточность» расчетов среднего арифметического значения не влияет на окончательный вердикт: **чувствительность ЛАЛ-реактива подтверждена.** Расчеты - это промежуточный этап обработки результатов опыта, на основе расчетов делается вывод. И на этот вывод принцип расчетов не оказывает серьезного влияния.

В упрощении оценок результатов опыта можно пойти и дальше. В ОФС условия, при которых опыт считается достоверным, сформулированы таким образом, что если результаты не укладываются в оговоренные рамки, то необходимость в расчетах отпадает. Для того, чтобы совсем упростить интерпретацию результатов, можно рекомендовать использовать схему, приведенную в Табл. 5.

Табл. 5. Условия, при которых опыт может считаться достоверным.

	2λ	λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+/-	+/-	-	-
2	+	+/-	+/-	-	-
3	+	+/-	+/-	-	
4	+	+/-	+/-	-	

В невыделенных цветом ячейках результаты могут разными (+ или -). Серым цветом выделены ячейки, в которых результаты должны быть однозначными (только плюс или только минус). Если результаты опыта укладываются в эти рамки, то расчеты можно и не проводить, а чувствительность ЛАЛ-реактива можно считать подтвержденной.

Таким образом, понять, что получилось, можно сразу, достаточно взглянуть на таблицу результатов. Обсчет этих результатов является формальной операцией. Но, если такие расчеты делаются, то делать их следует по правилам, приведенным в ОФС.

И еще одно замечание: фраза «...Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной и используется в дальнейших расчетах...» означает, что вне зависимости от того, какой количественный результат получен в опыте, он является справочным (промежуточным, т.е. используется только для того, чтобы сделать правильный вывод), это не «реальная» чувствительность ЛАЛ-реактива. Реальная чувствительность указана на этикетке. Поэтому при дальнейшей работе с этим реактивом используется значение чувствительности, указанное на этикетке. В сущности, опыт называется «Подтверждение заявленной чувствительности», а не «определение чувствительности».

Подготовка растворов КСЭ для проведения опыта.

Выше отмечалось, что в инструкциях к ЛАЛ-реактиву для гель-тромб теста разных производителей в части описания опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» схемы его подготовки практически идентичны. Причину единого подхода следует искать в самых первых редакциях статей «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США и даже в «дофармакопейный» период, когда только отрабатывались вопросы стандартизации КСЭ и калибровки ЛАЛ-реактива. Для этой калибровки была рекомендована вполне определенная схема подготовки разведений стандарта эндотоксина. И сегодня эти принципы и правила, заложенные более тридцати лет назад, остаются в силе.

Типовая схема подготовки растворов после разведения лиофилизированного препарата КСЭ может быть условно разделена на два этапа.

Первый этап - доведение концентрации исходного раствора КСЭ до 1,0 ЕЭ/мл. Обычно это несколько последовательных разведений исходного раствора с шагом не более чем в 10 раз.

Второй этап - получение растворов КСЭ с концентрациями, которые будут поставлены в опыт (2λ, λ, 0,5λ и 0,25λ). Для этого делают серию последовательных двукратных разведений, начиная с раствора с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл. Рекомендуемые объемы КСЭ и воды для ЛАЛ-теста обычно по 1,0 мл. Схема подготовки разведений на втором этапе выглядит следующим образом.

Табл. 6. Стандартная схема подготовки разведений КСЭ

Пробирка №	Вода (мл)	Объем КСЭ, добавленный к воде	Конц-я эндотоксина, ЕЭ/мл
1	1,0	1 мл с конц. 1 ЕЭ/мл	0,5
2	1,0	1 мл из пробирки №1	0,25
3	1,0	1 мл из пробирки №2	0,125
4	1,0	1 мл из пробирки №3	0,06
5	1,0	1 мл из пробирки №4	0,03
6	1,0	1 мл из пробирки №5	0,015

и т.д. до концентрации, соответствующей 0,25λ

Эта последовательность полностью повторяет схему разведений Международного стандарта эндотоксина, который используется для определения чувствительности новой серии ЛАЛ-реактива. Несмотря на то, что приведенная схема подготовки анализа выглядит несколько перегруженной, нет оснований вносить в нее серьезные

изменения. Анализ важен, перестановка его нежелательна, поэтому лучше потратить несколько лишних пробирок и быть уверенными в том, что на результаты не оказали влияние технические ошибки, связанные с подготовкой разведений КСЭ. Единственное, что можно изменить совершенно безболезненно, то это объемы воды и КСЭ. Практика показывает, что без ущерба для точности разведений эти объемы вполне могут быть сокращены до 0,5 мл.

Подтверждение чувствительности ЛАЛ-реактива и рутинные анализы.

Концепция, положенная в основу анализа «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», буквально пронизывает всю систему проверки лекарственных препаратов по показателю «Бактериальные эндотоксины». Действительно, если внимательно присмотреться к схемам проведения качественного и количественного анализа, можно заметить, что в каждом из них присутствуют фрагменты анализа «Подтверждение заявленной чувствительности» (Табл. 7-9).

В несколько сокращенном виде он повторяется в количественном анализе в качестве положительного контроля опыта. Используются те же концентрации КСЭ и вода, но в опыте они ставятся в двух повторностях. Вообще, такой контроль опыта можно назвать «расширенным», и его рекомендуют проводить ежедневно в первом опыте (инкубировании), причем неважно, качественный это опыт или количественный. По результатам, полученным для такого контроля, можно судить об изменениях, которые произошли с ЛАЛ-реактивом во время его хранения как в лиофилизированном, так и в замороженном виде.

В качественном анализе можно тоже увидеть остатки схемы анализа «Подтверждение заявленной чувствительности», но в редуцированном виде. Из четырех разных концентраций КСЭ оставлена только одна 2λ, в которой обязательно должен образоваться гель. Также оставлен отрицательный контроль, который во всех опытах проводится в двух повторностях.

Табл. 7. Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива»

	2λ	λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	
4	+	+	-	-	

Самостоятельный опыт, целью которого является проверка качества новой серии ЛАЛ-реактива.

Табл. 8. Анализ стандартной серии разведений КСЭ

	2λ	λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-

Фрагмент контрольного анализа, цель - подтверждение неизменности качества реактивов при хранении. Анализ необходимо проводить периодически, желательно ежедневно с первым инкубированием.

Табл. 9. Положительный и отрицательный контроли опыта

	2λ				К-
1	+				-
2	+				-

Фрагмент контрольного анализа, цель - простое подтверждение работоспособности ЛАЛ-реактива.

Несложно заметить, что основным стержнем системы обеспечения достоверности рутинных анализов является анализ «Подтверждение заявленной чувствительности», с него все начинается, и фрагменты этого анализа присутствуют в каждом опыте.

Условия, при которых необходимо повторение опыта.

В ОФС о необходимости повторения опыта сказано следующее:

«Анализ проводят для каждой новой серии используемого ЛАЛ-реактива, а также при изменении условий эксперимента, используемых материалов и реактивов, способных повлиять на результаты теста.»

Этот фрагмент оставляет довольно широкие возможности для трактовки особенно в той части, которая касается изменений условий проведения опыта, используемых материалов и т.д. Но, как уже отмечалось выше, основным условием повторения опыта является получение новой серии ЛАЛ-реактива. Точнее, даже не серии, а вновь поступивших реактивов. Даже если номер новой серии совпадает с номером серии уже проверенного реактива, опыт должен быть проведен, поскольку в данном случае основная его задача заключается в подтверждении того, что реактив не утратил своих свойств в результате транспортировки.

В заключение разберем вопросы оформления результатов опыта. Анализ важен и его результаты актуальны, как минимум, до тех пор, пока не кончится проверенная серия ЛАЛ-реактива. Следовательно, и оформлены эти результаты должны быть соответствующим образом. Единой рекомендованной формы оформления протоколов анализа нет, тем не менее, можно выделить некоторые позиции, которые желательно отразить в протоколе:

- Назначение анализа (Подтверждение чувствительности, валидация оборудования, аттестация и т.д.);
- Сведения о ЛАЛ-реактиве (номер серии, чувствительность реактива);
- Сведения о КСЭ (номер серии, количество ЛПС во флаконе, активность КСЭ в ЕЭ/нг и концентрация КСЭ в исходном растворе в ЕЭ/мл);
- Представление данных опыта в табличной форме;
- Расчетное значение чувствительности ЛАЛ-реактива по результатам опыта;
- Выводы (заявленная чувствительность соответствует/не соответствует значению, указанному на этикетке);
- ФИО аналитика, проводившего опыт;
- Дату проведения опыта.

Литература

ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины» Москва, 2000 г.

Проект ОФС «Бактериальные эндотоксины».

Bacterial endotoxins, 2.6.14., European Pharmacopoeia, III Ed., Strasbourg France. Supp. 2001.

The United States Pharmacopoeia, 24-th Ed. Suppl. 2. 2000.

"Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices". // U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

Лизат Амебоцитов Limulus Endosafe Инструкция по применению // Charles River Endosafe.

Введение раздела «Бактериальные эндотоксины» в ОФС. Предварительные анализы.

Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №1 (6) 2004

К наиболее фундаментальным действиям, проводимым при введении показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармакопейную статью предприятия на лекарственный препарат, можно отнести расчет значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов в препарате и проведение анализа «Мешающие факторы». Вопросу расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов был посвящен один из предыдущих номеров нашего бюллетеня (ЛАЛ-тест № 3. 2003). Анализ «Мешающие факторы» и является собственно валидацией ЛАЛ-теста для лекарственного препарата. Схема проведения анализа

«Мешающие факторы» описана в ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины». В ОФС приведены и требования, которым должен соответствовать испытуемый препарат или его разведение, испытываемое в опыте:

Испытанию может быть подвергнут препарат в любом разведении, не превышающем значения МДР. Используемые в данном анализе пробы испытуемого препарата (или его разведения) не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах.

Если присутствие мешающих факторов обнаружено для испытуемого препарата, который проверялся в разведении меньшем МДР, анализ может быть повторен для разведения, равного МДР. В большинстве случаев дополнительное разведение испытуемого препарата способно снять действие мешающих факторов. Использование ЛАЛ-реактива большей чувствительности позволяет увеличить степень разведения.

Для успешного проведения анализа «Мешающие факторы» необходимо испытывать препарат в разведении, не ингибирующим реакцию. Следовательно, необходимо заранее выяснить: способен ли препарат ингибировать реакцию, и в каком разведении это ингибирование снимается. Анализ «Мешающие факторы» способен выявить и возможность усиления реакции ЛАЛ-реактива и эндотоксина, что выражается в виде получения положительных результатов при фактическом отсутствии эндотоксинов в испытуемом растворе. Но с уверенностью можно говорить об усилении реакции только, зная, что в испытуемом растворе не содержится эндотоксинов. Следовательно, проводить анализ «Мешающие факторы» можно только для разведений испытуемого препарата, в которых концентрация эндотоксина не обнаруживается ЛАЛ-реактивом с используемой чувствительностью. Выбрать разведение, в котором соблюдаются оба этих условия, можно только после предварительной проверки испытуемого препарата. Несмотря на то, что проведение предварительных анализов не предписано официальными документами, оно является целесообразным действием, позволяющим сократить время и расход реактивов при проведении анализа «Мешающие факторы». Поскольку из проявлений мешающих факторов наибольшую проблему представляет ингибирование, то и предварительные анализы построены таким образом, чтобы выявить это ингибирование. Одновременно выясняется и концентрация эндотоксинов в испытуемых сериях.

Опыт очень похож на количественный гель-тромб тест, описанный в ОФС. Испытуемый препарат проверяют в ряду

последовательных двукратных разведений, определяют конечную точку реакции, по которой рассчитывают концентрацию эндотоксинов. Отличие от фармакопейного анализа заключается в том, что положительный контроль испытуемого образца (испытуемое разведение, к которому добавлен эндотоксин в концентрации 2 л) ставят не для одного наименьшего разведения, а для всех разведений, испытываемых в опыте. Т.е. в анализе параллельно испытываются два ряда разведений испытуемого препарата: один без эндотоксина, к другому добавлен эндотоксин в известной концентрации, которая гарантирует образование геля. Следует отметить, что по результатам этого опыта нельзя обнаружить усиление реакции.

Рассмотрим разные варианты результатов опытов и правила интерпретации результатов. Например, исследуется препарат, предельное содержание бактериальных эндотоксинов в котором должно быть не более 4 ЕЭ/мл. Чувствительность ЛАЛ-реактива – 0,03 ЕЭ/мл. Значение максимально допустимого разведения в этом случае равно 1/128. В приведенных примерах стандартные контроли не указаны.

Пример 1.

Разведения испытуемого препарата							
1:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+

Разведения испытуемого препарата с КСЭ в конц. 2л							
1:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+

Результаты и интерпретация.

Препарат не ингибирует реакцию. Содержание бактериальных эндотоксинов в проверяемой серии испытуемого препарата точно определить невозможно. Можно говорить только, что оно более 4 ЕЭ/мл (128*0,03125 ЕЭ/мл = 4 ЕЭ/мл). Возможно, содержание эндотоксинов настолько велико, что оно полностью маскирует проявление ингибирующего действия препарата. Данная серия не может быть использована для проведения анализа «Мешающие факторы».

Комментарии. Само по себе высокое содержание эндотоксинов в одной серии не означает невозможность введения раздела «Бактериальные эндотоксины» и проведения валидации метода. Необходимо подобрать другую серию с низким содержанием эндотоксина. В том случае, если и остальные серии такого же качества, стоит задуматься о состоянии производства. Не следует также думать, что анализ «Пирогенность» для такого препарата позволит пропускать серии,

бракуемые ЛАЛ-тестом. Значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов соответствует пороговой пирогенной дозе, и превышение ее будет вызывать пирогенный ответ у кроликов.

Пример 2.

Разведения испытуемого препарата							
1:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1			8	6	2	4	8
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
Разведения испытуемого препарата с КСЭ в конц. 2λ							
1:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1			8	6	2	4	8
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-

Результаты и интерпретация.

Препарат ингибирует реакцию, и разведение препарата не снимает ингибирование реакции. Содержание бактериальных эндотоксинов в проверяемой серии испытуемого препарата определить невозможно. Эндотоксинов может не быть вообще. Возможно, присутствие эндотоксина маскируется ингибирующим действием препарата. Проводить анализ «Мешающие факторы» для такого препарата можно, только устранив ингибирующее действие.

Комментарии. Самый простой и надежный способ снятия ингибирования - это разведение испытуемого препарата. Чем чувствительней ЛАЛ-реактив, тем больше степень разведения. Из сказанного следует, что при проведении предварительных исследований наиболее предпочтительно использование ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл. В данном примере увеличить степень разведения невозможно. Необходимо отработать методику снятия ингибирования.

Пример 3.

Разведения испытуемого препарата							
1:1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
+	+	+	+	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-
Разведения испытуемого препарата с КСЭ в конц. 2λ							
1:1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
-	-	+	+	+	+	+	+
-	-	+	+	+	+	+	+

Результаты и интерпретация.

Препарат ингибирует реакцию до разведения 1/2 включительно. Содержание бактериальных эндотоксинов в проверяемой серии испытуемого препарата равно 0,25 ЕЭ/мл ($8 \cdot 0,03125$ ЕЭ/мл = 0,25 ЕЭ/мл).

Данная серия может быть использована для проведения анализа МФ. Анализ можно проводить для разведения более 1/8.

Комментарии. При выборе степени разведения для проведения анализа «Мешающие факторы» следует помнить, что концентрация эндотоксина может колебаться от серии к серии. Поэтому необходимы данные по нескольким сериям испытуемого препарата. Другими словами исследовать надо каждую серию, для которой будет проводиться анализ «Мешающие факторы».

Пример 4.

Разведения испытуемого препарата							
1:1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
+	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
Разведения испытуемого препарата с КСЭ в конц. 2λ							
1:1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
-	-	-	+	+	+	+	+
-	-	-	+	+	+	+	+

Результаты и интерпретация.

Препарат ингибирует реакцию до разведения 1/4 включительно. Содержание бактериальных эндотоксинов в проверяемой серии испытуемого препарата точно определить невозможно. Можно только утверждать что оно не более 0,25 ЕЭ/мл ($8 \cdot 0,03125$ ЕЭ/мл = 0,25 ЕЭ/мл). Этот расчет сделан по результатам, полученным для препарата, к которому был добавлен эндотоксин. Известно, что ингибирование пропадает в разведении 1/8, и в этом разведении эндотоксины не обнаружены.

Данная серия может быть использована для проведения анализа «Мешающие факторы». Анализ можно проводить для разведения более 1/8.

Комментарии. В отличие от случайной концентрации эндотоксинов, ингибирование - свойство относительно постоянное. Оно, как правило, связано с концентрацией активного вещества и, соответственно, незначительно будет изменяться от серии к серии.

Из приведенных примеров первые два носят скорее теоретический характер, на практике такие результаты встречается редко. Наиболее часто встречаются варианты, рассмотренные в примерах 3 и 4.

При проведении предварительных анализов совершенно необязательно ставить ряды двукратных разведений испытуемого препарата до МДР включительно. Можно разработать собственную схему проведения анализов, оптимизировав расход реактивов. В рассмотренных примерах значение МДР препарата относительно невелико, и постановка анализа для ряда двукратных разведений выглядит обоснованным действием. В том случае, если МДР более

1/1000, предварительные анализы могут быть разделены на два этапа. Сначала испытывают препарат в разведениях с большим шагом, например, 1:10 (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000). Такой анализ позволяет сделать предварительную оценку неингибирующей концентрации. Затем можно переходить к двукратным разведениям в определенном диапазоне, чтобы точно определить значение концентрации эндотоксинов или неингибирующую концентрацию (разведение) испытуемого препарата. В том случае, если качество препарата совершенно неизвестно, и есть опасение, что концентрация эндотоксина в нем может быть высока, целесообразно провести простой качественный анализ для максимального разведения. И убедившись в том, что содержание эндотоксинов ниже предельно допустимого, можно переходить к проведению предварительных анализов.

Перед проведением опыта следует измерить pH испытуемого препарата и его разведений. Значение pH часто оказывается причиной ингибирования. Наиболее правильное действие - измерение значения pH реакционной смеси (ЛАЛ-реактив + испытуемый препарат). Технически же удобнее измерять pH испытуемого препарата или его разведений, которые можно готовить на дистиллированной воде и в объемах, достаточных для измерения стандартным pH-метром. В ОФС указано, что значение pH испытуемого препарата должно быть в диапазоне 6-8. Предварительно определив значения pH препарата и его разведений, можно исключить из ряда разведений, испытываемых в предварительных анализах, те разведения, в которых значения pH сильно отличаются от указанного диапазона.

В заключении необходимо коснуться вопроса интерпретации результатов, полученных при проведении предварительных анализов. Полученные данные позволяют принять решение о выборе той степени разведения препарата, для которой можно провести анализ «Мешающие факторы». Считается правильным проводить этот анализ в разведении вдвое большим того разведения, при котором исчезает ингибирующее действие. Так, если препарат ингибирует реакцию в разведениях до 1/2, а в разведении, равном 1/4, ингибирование пропадает (Пример 3), то валидацию проводят для разведения 1/8 или для большего разведения. Для простоты подготовки испытуемых образцов при проведении анализа «Мешающие факторы» это значение можно округлить до 1/10 или даже 1/20. Так делается поправка на возможные различия, зависящие от конкретной серии. На выбор степени разведения может повлиять и реальное содержание эндотоксина, обнаруженное в предварительном тесте. Например, если эндотоксин обнаруживают в разведениях до 1/8, то валидацию для такого

препарата целесообразно проводить для разведений от 1/32. Стоит обратить внимание на то, что в приведенных примерах рассматривались результаты, полученные для одной серии препарата. Анализ «Мешающие факторы» проводят на нескольких сериях (3-5 сериях). Поэтому целесообразно проводить предварительные анализы для всех серий, отобранных для проведения валидации. Принимать решение о выборе степени разведения для постановки анализа «Мешающие факторы» можно только после обобщения результатов, полученных для всех испытуемых серий.

Литература.

Case MJ, Ryther SS, Novitsky TJ Detection of endotoxin in antibiotic solutions with Limulus amoebocyte lysate. Antimicrob // Agents Chemother 1983 May;23(5):649-652.

Cooper J.F. Using validation to reduce LAL pH measurements. // LAL Times 1997.,Vol.4.,No.2

Cooper J.F. Validation of bacterial endotoxins test methods. LAL Times 1999 Vol. 6.,No.2,

Dawson M.E. Preliminary testing. // LAL Update, 1996, Vol.14.,No.1

Dawson M.E. Inhibition and enhancement testing. Part 2.// LAL Update 1997 Vol. 15.,No.1/

Novitsky T., ed. Preliminary Inhibition Test.// LAL Update 1984 Vol. 2.,No.3, Suppl.

Проведение анализа «Мешающие факторы»

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №2 (7) 2004

В настоящей статье мы продолжим тему, начатую в предыдущем номере: «Валидация ЛАЛ-теста для лекарственного препарата». Валидация включает проведение анализа «Мешающие факторы» (МФ). В ОФС указывается:

«Испытанию может быть подвергнут препарат в любом разведении, не превышающем значения МДР. Используемые в этом анализе пробы испытуемого препарата (или его разведения) не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах».

Определить содержание бактериальных эндотоксинов и возможность ингибирования можно на стадии проведения предварительных анализов. Когда свойства испытуемого препарата известны, можно переходить к проведению анализа «Мешающие факторы». Определенную проблему обычно вызывает выбор степени разведения, в котором стоит проводить этот

анализ. Действительно, выбор степени разведения для проведения анализа «Мешающие факторы» прямо влияет на возможность использования ЛАЛ-реактивов разной чувствительности и, что более ценно, определяет возможность проведения контрольных анализов для нескольких образцов в объединенной выборке.

Последующие объяснения лучше всего приводить, используя в качестве примера гипотетический вариант: есть препарат, для которого установлено значение предельного содержания бактериальных эндотоксинов не более 10 ЕЭ/мл, а по результатам предварительных анализов известно, что ингибирование преодолевается в разведении 1/10.

Значение МДР для разных реактивов будет следующим:

ЛАЛ-реактив	МДР
0,25 ЕЭ/мл	40
0,125 ЕЭ/мл	80
0,06 ЕЭ/мл	160
0,03 ЕЭ/мл	320

Если валидировать метод для разведения, равного 1/40 или меньшего, то последующие анализы можно будет проводить с использованием ЛАЛ-реактивов любой чувствительности. Если же провести анализ «Мешающие факторы» для разведения 1/80, то в дальнейших анализах нельзя будет использовать ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,25 ЕЭ/мл, поскольку согласно ОФС разрешается проводить анализы в разведении равном или большим, того разведения, в котором проводился анализ «Мешающие факторы».

Следующий аргумент представляется более весомым. Проверка серии лекарственного препарата предполагает проверку нескольких выборок из серии, количество которых определяется количеством единиц продукции в серии. Т.е. для проведения контрольных анализов, в том числе и анализа «Бактериальные эндотоксины», отбирается некоторое количество образцов, обычно представляющих начало, середину и конец проверяемой серии. В ОФС в разделе «Подготовка образца» указано, что каждый образец должен проверяться индивидуально. Несмотря на это указание можно объединять образцы и проводить проверку такой объединенной пробы. Однако, при этом необходимо делать поправку на возможность усреднения концентрации эндотоксинов в объединенной пробе. Делается это потому, что теоретически возможна ситуация, при которой у части образцов содержание эндотоксинов выше, а у части ниже допустимого значения. При объединении образцов проб может произойти усреднение концентрации эндотоксинов, при котором

среднее значение будет соответствовать норме. Например:

	Содержание БЭ
Образец 1	3 ЕЭ/мл
Образец 2	5 ЕЭ/мл
Образец 3	15 ЕЭ/мл
Среднее значение	7,67 ЕЭ/мл

Среднее значение менее 10 ЕЭ/мл, но содержание эндотоксинов в одном из проверенных образцов выше допустимого предельного содержания эндотоксинов, установленного для препарата. Такая серия должна быть забракована именно по результатам, полученным для третьего образца.

Следовательно, при проверке нескольких образцов в объединенной выборке необходимо делать пересчет значения допустимой концентрации бактериальных эндотоксинов с поправкой на количество объединенных образцов. Например, если проверяется три образца одновременно, предельное содержание бактериальных эндотоксинов, установленное для препарата, делят на три. Полученное значение используют для расчета МДР для объединенной пробы. Очевидно, что значение МДР пропорционально уменьшается.

Если продолжить пример с препаратом, для которого предельное содержание эндотоксинов должно быть менее 10 ЕЭ/мл, то картина изменения значений МДР для нескольких образцов будет выглядеть следующим образом:

Чувствительность ЛАЛ-реактива	Кол-во объединенных образцов			
	2	3	4	5
0,25 ЕЭ/мл	20	13,3	10	8
0,125ЕЭ/мл	40	26,6	20	16
0,06 ЕЭ/мл	80	53,3	40	32
0,03 ЕЭ/мл	160	106,6	80	64

Расчеты делаются следующим образом:

Количество объединенных образцов – два. Значение предельного содержания БЭ для двух образцов = $10 \text{ ЕЭ/мл} \div 2 = 5 \text{ ЕЭ/мл}$, МДР для ЛАЛ-реактива 0,25 ЕЭ/мл = $5 \text{ ЕЭ/мл} \div 0,25 \text{ ЕЭ/мл} = 20$.

Если анализ «Мешающие факторы» провести для разведения 1/40, контрольные анализы можно будет проводить в разведениях 1/40 и больших, следовательно, в случае использования ЛАЛ-реактива 0,25 ЕЭ/мл возможна только индивидуальная проверка каждого образца, с ЛАЛ-реактивом 0,06 ЕЭ/мл можно проверять 4 образца одновременно. А с ЛАЛ-реактивом 0,03 ЕЭ/мл возможна проверка объединенной выборки, включающей до 8 единиц.

Если анализ «Мешающие факторы» провести в разведении 1/320, то проверка препарата будет возможна только с помощью ЛАЛ-реактива 0,03, и каждый образец должен

будет проверяться индивидуально. Конечно, не всегда следует стремиться к объединению очень большого количества образцов. Вполне разумным представляется анализ для трех объединенных выборок. В любом случае, чем меньше степень разведения, в которой проводится анализ «Мешающие факторы», и чем выше чувствительность ЛАЛ-реактива, тем больше образцов может быть проверено одновременно.

Третий аргумент в пользу валидации малых разведений испытуемого препарата заключается в том, что рутинная проверка в разведениях, меньших МДР, может служить дополнительной гарантией безопасности препарата. Действительно, часто производители сами устанавливают свои внутренние нормы качества, которые гораздо жестче показателей, включенных в НД. Это дает большую уверенность при выпуске серии и может служить в качестве внутрипроизводственной нормы, которая может использоваться в качестве уровня тревоги или действия аналогично нормам, устанавливаемым для технологических процессов. Проведение постоянного контроля в разведениях, значительно меньших МДР, позволяет вовремя заметить изменения, приводящие к ухудшению качества. Важно и то, что если при выпуске на реализацию препарат проходит тест в разведении, меньшем МДР, это означает, что он точно пройдет любую повторную проверку, которую независимые контрольные лаборатории проводят в разведении, близком к МДР.

Из всего сказанного следует, что проводить анализ «Мешающие факторы» надо в разведении как можно меньшем. Принимая этот тезис в качестве руководства к действию, не надо стремиться избавиться во что бы то ни стало от ингибирования в малых разведениях и не стоит вводить без необходимости специальные приемы устранения ингибирования, и вводить их в методику подготовки образца.

Известно, что почти все препараты способны ингибировать реакцию в высоких концентрациях (исходные растворы). В большинстве случаев разведение водой для ЛАЛ-теста оказывается достаточным для того, чтобы преодолеть это ингибирование. Так самый простой и распространенный пример ингибирования – это значение рН, выходящее за рамки оптимального диапазона, в котором проводится реакция. Но даже в этом случае можно ограничиться простым разведением водой, а не вводить в методику процедуру доведения рН. Можно проиллюстрировать эти рассуждения следующим примером. Предположим, что рассматриваемый нами препарат в случае подготовки его разведений с помощью буферного раствора может быть валидирован в разведении 1/10, а в случае доведения значения рН исходного раствора с помощью раствора кислоты (или щелочи)

анализ можно проводить в разведении 1/2. Лучше все-таки проводить валидацию в разведении 1/40 на воде. В этом случае все операции по подготовке к проведению контрольных анализов будут минимальны и не будут требовать использования специальных растворов. Учитывая тот факт, что контрольные анализы могут проводиться ежедневно: чем проще процедура подготовки – тем лучше. Введение специальных методов подготовки образца требует проведения дополнительной проверки этих методов или растворов на содержание эндотоксинов и на их способность оказывать влияние на ход реакции. Дополнительные процедуры по подготовке образца нужны тогда, когда без них невозможно обойтись или в случае проведения исследований, когда необходимо определить концентрацию эндотоксинов в препарате, не смотря на ингибирование.

Резюмировать рассуждения о выборе степени разведения для постановки опыта «Мешающие факторы» можно следующими рекомендациями:

1. Разведение, выбранное для постановки опыта «Мешающие факторы», должно быть как можно меньшим;
2. В выбранном разведении не должно проявляться ингибирование;
3. В выбранном разведении во всех сериях, используемых для проведения анализа МФ, не должно содержаться эндотоксинов;
4. В качестве подготовки испытуемого образца для анализа лучше всего использовать его разведение водой для ЛАЛ-теста.

Как уже отмечалось, решение по валидируемому разведению принимают после проведения предварительных анализов. В качестве общих рекомендаций можно посоветовать следующий подход: анализ «Мешающие факторы» следует проводить в разведении, в котором ингибирование пропадает для всех испытанных в предварительных анализах сериях. Если значение МДР для данного препарата велико, то лучше проводить анализ в разведении в 2-4 раза большем максимального неингибирующего разведения.

Например, если препарат не ингибирует реакцию в разведении 1/10, то валидировать можно в разведении 1/20 (в два раза большем) или лучше в 1/40 (в четыре раза большем). При этом учитывается возможность колебаний от серии к серии способности препарата ингибировать реакцию.

Проведение анализа «Мешающие факторы» является не очень сложной процедурой, правда подготовка к этому анализу отличается от обычной подготовки к проведению опыта. В ОФС приведена следующая схема опыта «Мешающие факторы»:

Раствор	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация эндотоксина в испытуемом растворе	Количество повторностей
A	Испытуемый препарат, содержащий КСЭ концентрации 2λ	Испытуемый препарат	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
B	Испытуемый препарат	-	-	-	4
C	Раствор КСЭ в Воде для ЛАЛ-теста концентрацией КСЭ - 2λ	Вода для ЛАЛ-теста	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0,5λ	2
			8	0,25λ	2
D	Вода для ЛАЛ-теста	-	-	-	2

Опыт в обычном табличном представлении результатов выглядит несколько проще, например:

Концентрация КСЭ в растворе препарата					
повторности	1/40 (2λ)	1/40(λ)	1/40 (0,5λ)	1/40 (0,25λ)	1/40 (К-)
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-
Концентрация КСЭ в воде для ЛАЛ-теста (контроли)					
повторности	2λ	λ	0,5λ	0,25λ	К-
1	+	+	-	-	-
2	+	+	-	-	-

В данном примере анализ ставится для разведения испытуемого препарата, равного 1/40. Можно легко заметить, что верхняя часть таблицы практически полностью повторяет схему опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Имеются два отличия: КСЭ разводится не водой для ЛАЛ-теста, а испытуемым препаратом, раствор которого используется и для постановки отрицательного контроля. Этот отрицательный контроль ставится в четырех повторностях – это второе отличие от стандартного подтверждения чувствительности.

Вторая часть таблицы – стандартный анализ разведений КСЭ, служащий контролем всего опыта, это уже точное повторение опыта «Подтверждение заявленной чувствительности» только в двух повторностях. В сущности, анализ «Мешающие факторы» является подтверждением чувствительности ЛАЛ-реактива. Его результаты должны показать, что ЛАЛ-реактив реагирует с серией разведений КСЭ в растворе испытуемого препарата так же, как он реагирует с эндотоксином в водном растворе. Среднее значение определенной в опыте концентрации эндотоксина рассчитывается так же, как и по результатам опыта «Подтверждение заявленной чувствительности». В ОФС приводятся следующие требования к результатам опыта:

«Если полученное среднее значение чувствительности оказалось не менее 0,5λ и не более 2λ, испытуемый препарат в выбранном разведении не содержит мешающих факторов, способных ингибировать и/или усилить реакцию ЛАЛ-реактива с бактериальными эндотоксинами, и может быть подвергнут анализу на содержание бактериальных эндотоксинов».

Еще раз подчеркнем, что особых сложностей подготовка этого опыта не представляет, единственный его недостаток это то, что он достаточно громоздкий, т.к. анализ должен проводиться в четырех повторностях, и опыт должен быть повторен на трех сериях. Некоторые сложности представляет техническая сторона подготовки растворов, отличная от обычных количественных анализов, в которых испытываются убывающие концентрации испытуемого препарата. В данном же случае концентрация (разведение) испытуемого препарата должна быть одинаковой, а меняться должна концентрация КСЭ от 2λ до 0,25λ. Способы подготовки растворов могут быть разными. Можно рекомендовать следующий, пожалуй, самый простой способ подготовки испытуемых растворов:

1. Подготовка разведения испытуемого препарата вдвое большего того, которое будет поставлено в опыте (например, подготовка разведения 1/20, при постановке в опыте разведения 1/40). Объем раствора должен быть 0,6-0,7 мл;

2. Подготовка разведения испытуемого препарата 1/40. Общий объем раствора должен быть 2,2- 2,5 мл;

3. Подготовка раствора КСЭ с концентрацией 4λ, объем которого должен быть 0,6-1,0 мл.

Пустые пробирки для разведений подписывают, указывая концентрацию КСЭ и степень разведения препарата, например, «1/40 (2λ)» и т.д. В первую пробирку, концентрация КСЭ в которой будет 2λ, вносят равные части раствора препарата 1/20 и раствора КСЭ 4λ (например, по 0,5 мл), раствор перемешивают на вихревой мешалке. В получившемся растворе концентрации КСЭ и препарата снизились вдвое. Концентрация КСЭ стала 2λ, а разведение препарата стало 1/40. Далее надо только снижать концентрацию КСЭ, оставляя степень разведения препарата неизменной. Для этого в следующую пробирку переносят 0,5 мл получившегося раствора и добавляют 0,5 мл раствора испытуемого препарата в разведении 1/40, концентрация КСЭ снижается вдвое до λ, степень разведения препарата не изменяется. Операцию повторяют до получения концентрации КСЭ 0,25λ. На эти растворы используется 1,5 мл раствора препарата в разведении 1/40.

Остаток раствора 1/40 (0,5 - 1,0 мл) используют для постановки контроля (К-). Одновременно с подготовкой разведений КСЭ в растворе испытуемого препарата готовят разведения КСЭ в воде для ЛАЛ-теста. Для их подготовки можно использовать раствор КСЭ с концентрацией 4λ, продолжая его разведения на воде для ЛАЛ-теста. По 0,1 мл каждого из приготовленных растворов переносят в пробирки для реакции (10x75мм), добавляя по 0,1 мл ЛАЛ-реактива и проводят инкубирование.

Приведенный способ подготовки к опыту, возможно, не самый короткий, его достоинство в том, что он прост, а использование относительно больших объемов (отношение 0,5 мл + 0,5 мл) дает большие гарантии точности их приготовления. Могут быть и другие способы подготовки растворов для проведения анализа, отличные от приведенного в данном примере. Закончить часть, посвященную технике подготовки и постановки опыта, хочется советом. Не следует стремиться, особенно в первый раз, проводить опыт сразу для нескольких серий в одном инкубировании. Один такой тест - это 30 пробирок с разными растворами. В таком количестве можно запутаться, допустить ошибки и, наконец, проблемой может оказаться быстрое добавление ЛАЛ-реактива ко всем пробиркам и такое же быстрое считывание результатов опыта.

Говоря о правилах проведения анализа «Мешающие факторы», нельзя не коснуться вопроса статистической достоверности опыта. Иными словами, вопрос в том: на скольких сериях он должен быть проведен, и какое количество образцов из серии должно быть в выборке. Этот вопрос хуже всего освещен в нормативной документации, причем не только в отечественной, но и в зарубежной. Единственный источник, который довольно

четко определяет требования к отбору образцов - это «Руководство по валидации ЛАЛ-теста, проводимого для контроля качества парентеральных лекарственных средств, вводимых человеку и используемых в ветеринарии, препаратов биологического происхождения и изделий медицинского назначения», изданное FDA в 1987 году. В Руководстве указывается, что анализ должен проводиться на трех сериях испытуемого препарата. Если препарат выпускается в разных формах, например, растворы 10%, 20%, 40%, то проверять можно серии с наименьшей и наибольшей концентрациями препарата при получении удовлетворительных результатов. Анализ для промежуточных концентраций можно не проводить. Что касается количества проверяемых образцов каждой серии, то их должно быть не менее трех и не более десяти, и представлять они должны начало, середину и конец серии. Такой подход к количеству испытуемых образцов представляется весьма обоснованным, особенно в части ограничения верхнего предела выборки. К сожалению, у нас пока нет аналогичного документа, детально описывающего правила проведения валидации метода, а приведенную выше информацию можно использовать только как справочную.

В заключении хочется еще раз отметить, что анализ «Мешающие факторы» является не пустой формальностью, а необходимым элементом построения системы контроля качества по показателю «Бактериальные эндотоксины». Этот анализ может считаться ключевым, обязательным и необходимым для каждого препарата, который предполагается испытывать в тесте «Бактериальные эндотоксины».

ПРОВЕДЕНИЕ РУТИННЫХ АНАЛИЗОВ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТА

Постановка контролей при проведении гель-тромб теста.

Чиркова М.Н., Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №1 (8) 2005

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 2λ. 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 2λ. 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 гель-тромб 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 2л. 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 4л или 20л.

При проведении последующих экспериментов в качестве положительного контроля используется раствор эндотоксина с концентрацией 2л. Такой контроль может быть подготовлен разными способами, в том числе и с помощью раствора КСЭ с концентрацией 20л. Готовится такой контроль непосредственно в пробирках для реакции: к 100 мкл воды для ЛАЛ-теста добавляют 10 мкл раствора КСЭ с концентрацией 20л. 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 2л, л, 0,5л, 0,25л), и раствор в концентрации 2л.

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 2л.

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.

Наиболее распространенные ошибки опыта и их причины

Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» № 1 (8) 2005

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 аликваты 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 пробирку 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 нередки 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 подготовить разведение в 4-8 раз. Если же необходимо подготовить 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 автоклавирувания. 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.

ДЕПИРОГЕНИЗАЦИЯ

Депириогенизация

Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» 2 (9) 2005

Депириогенизацией 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 депириогенизации являются, в сущности, способами устранения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Поэтому, несмотря на то, что сам термин «депириогенизация» 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 депириогенизации приводит к разрушению эндотоксинов, то он однозначно будет гарантировать и отсутствие других пирогенов (правда, это положение относится главным образом к процедуре термической депириогенизации).

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 депириогенизации. 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 повторений 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 фармакопоях 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 депирогенизации 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 депирогенизации. 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 грамметрической бактерии может находиться до 3,5 миллионов молекул эндотоксинов.

Методы инактивации или разрушения эндотоксинов.

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

Сухожаровая обработка при температуре 250°C в течение 30 минут приводит к практически полной инактивации эндотоксинов. Этот режим упомянут во всех фармакопоях. Ранее приемлемым режимом депирогенизации 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 депирогенизации и сформулировать представление об «идеальном» режиме депирогенизации. До появления ЛАЛ-теста адекватная количественная оценка режима была просто невозможна. В процессе изучения динамики

термической депирогенизации 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 депирогенизации 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 депирогенизации фактически означает и стерилизацию образцов, причем обратное утверждение неверно. Термическая (сухожаровая или паровая) стерилизация не всегда обеспечивает депирогенизацию 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 нетронутом 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 как минимум 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 депириогенизации

Чиркова М.Н., Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №2 (9) 2005

Из всех известных способов депириогенизации наиболее распространенным и доступным является термическая депириогенизация, этот способ устранения эндотоксинов считается и наиболее надежным. Метод широко применяется для финишной депириогенизации 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 депириогенизации 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?

Депириогенизация 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 «депириогенизация», нет и ясно сформулированного представления о том, к какому результату надо стремиться при

проведении этой процедуры. Отсутствует и описание способов оценки эффективности депириогенизации.

Приходится констатировать, что существующая на сегодняшний день отечественная нормативная база по процедуре депириогенизации 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 депириогенизации, принципов организации валидации этого процесса и концепции оценки результатов такой обработки. В качестве примера можно остановиться на правилах депириогенизации посуды, используемой при проведении ЛАЛ-теста.

Для проведения депириогенизации посуды необходим сухожаровой шкаф, способный обеспечивать нагрев до 250°C, а желательнее и больший. Если шкаф будет использоваться для одной этой цели, то объем камеры может быть небольшим – до 50-70 м³. Классическим режимом термической депириогенизации 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 депириогенизации 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 депириогенизируемыми 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: вверху, 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.*

РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ, ТЕХНИКА РАБОТЫ

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

Материалы Семинара «Проведение контрольных анализов в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины»

Для проведения гель-тромб теста не требуется сложного оборудования, так же как и нет необходимости в создании специальных «чистых» помещений. Опыт можно проводить в обычной химической или микробиологической лаборатории (стерильные боксы для ЛАЛ-теста не нужны). Все необходимое оборудование может быть размещено на площади 10-15м², причем часть оборудования может быть отнесена к категории общелабораторного оборудования, используемого для проведения других анализов. И все же к оборудованию и материалам предъявляются некоторые специфические требования, которые стоит учитывать при комплектации лаборатории для проведения ЛАЛ-теста. Конечно, наиболее важные компоненты тест-системы - это ЛАЛ-реактив и КСЭ. Очень важен также правильный выбор вспомогательных расходных материалов – пробирок, пипеток и т.д. Ниже приводится подробный перечень реактивов и материалов, используемых для проведения ЛАЛ-теста.

ЛАЛ-реактив. ЛАЛ-реактив представляет собой лиофильно высушенный препарат. Это водный экстракт (лизат) амебоцитов, содержащий все компоненты, необходимые для реакции с эндотоксином. Чувствительность ЛАЛ-реактива (λ , лямбда) выражается в единицах эндотоксина (ЕЭ/мл). Стандартный ряд чувствительности, предлагаемый всеми производителями ЛАЛ-реактива, соответствует значениям: 0,5 ЕЭ/мл; 0,25 ЕЭ/мл; 0,125 ЕЭ/мл; 0,06 ЕЭ/мл и 0,03 ЕЭ/мл, встречаются и реактивы с чувствительностью 0,015 ЕЭ/мл.

Наиболее распространенная фасовка – флаконы на 5 мл ЛАЛ-реактива. В инструкции к ЛАЛ-реактиву может быть указано, что объема воды для разведения необходимо взять несколько больше номинального. Например, для разведения ЛАЛ-реактива во флакон на 50 определений следует добавить 5,2 мл воды. Эти дополнительные 0,2 мл даются на потери. Есть флаконы на 10 или 16 определений, такая фасовка может быть удобна для лабораторий, редко проводящих анализы.

На этикетке флакона с ЛАЛ-реактивом указывается:

- чувствительность, выраженная в ЕЭ/мл;
- объем воды для ЛАЛ-теста, необходимый для разведения;
- количество определений, которое можно сделать с его помощью;
- условия хранения;
- номер серии и срок годности.

Контрольный стандарт эндотоксина, КСЭ. Контрольный стандарт представляет собой лиофилизированный высоко очищенный препарат ЛПС, как правило, *E.coli*. Основное предназначение контрольного стандарта эндотоксина заключается в обеспечении достоверности определения содержания бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-реактива. Принципиально важным является использование контрольного стандарта эндотоксина с ЛАЛ-реактивом той конкретной серии, которая использовалась для установления его активности. При работе с ЛАЛ-реактивом другой серии активность КСЭ может быть другой. Результат этого сравнения должен быть представлен фирмой-поставщиком в виде Сертификата анализа активности КСЭ. В Сертификате активность контрольного стандарта указывается в единицах эндотоксина, принятых США (*Endotoxin Unit, EU*). Эта единица соответствует единице Международного стандарта (*International Unit, IU*) и, соответственно, принятой в отечественной нормативной документации аббревиатуре ЕЭ. На флаконе с КСЭ указывается:

- штамм бактерии, из которого получен препарат эндотоксина;
- содержание эндотоксина в весовых единицах;
- условия хранения;
- номер серии и срок годности;
- (объем воды для ЛАЛ-теста, необходимый для разведения).

Вспомогательные расходные материалы

К вспомогательным компонентам или материалам можно отнести специальные пробирки, в которых проводится реакция, пробирки для разведения испытуемого препарата, воду для ЛАЛ-теста, специальные буферные растворы. Вспомогательные материалы для ЛАЛ-теста проходят тестирование на совместимость с реактивом. Использование таких материалов освобождает пользователя от проведения проверки самостоятельно. Общие требования к вспомогательным материалам следующие: они не должны содержать бактериальных эндотоксинов в количествах, способных вызывать гелирование ЛАЛ-реактива, и не должны оказывать влияния на ход реакции.

Вода для ЛАЛ-теста. К воде, используемой для разведения лиофилизированных ЛАЛ-реактива и контрольного стандарта эндотоксина, а также для приготовления разведений

испытуемого препарата, предъявляются особые требования. Главное из них – низкое содержание бактериальных эндотоксинов.

Вода поставляется в ампулах и флаконах объемом от 10 до 1000 мл. Наиболее популярная упаковка у нас в стране – флаконы по 50 мл. Флаконы этого объема кажутся универсальными, удовлетворяющими запросы как крупных потребителей, так и небольших лабораторий. В действительности, универсальным является весь номенклатурный ряд. Так, очень полезными могут быть ампулы или флаконы с 10 - 30 мл воды. Если анализы проводятся редко, такие ампулы снимают проблему хранения вскрытого, но не использованного флакона с водой, качество воды в котором может ухудшаться при долгом хранении. Также ампулы позволяют легко решить проблему, возникающую при разведении нового флакона с ЛАЛ-реактивом. Для этой цели желательно использовать новый флакон с водой для ЛАЛ-теста. Флаконы объемом 100 мл могут быть полезными для организаций, где анализы проводятся часто и, соответственно, расходуется большое количество воды. Использование крупных фасовок приводит к снижению затрат на расходные материалы.

Растворы для коррекции pH. В том случае, если необходимо доведение значения pH испытуемого препарата до нормы, используют 0,1N растворы NaOH и HCl или буферные растворы. Эти растворы должны быть стерильны, не должны содержать эндотоксинов в определяемых в тесте количествах и не должны оказывать влияния на ход реакции (не должны содержать мешающих факторов). Растворы кислоты или щелочи (NaOH (0,1N) и HCl (0,1N)) используются в том случае, если испытуемый препарат имеет сильную щелочную или кислую реакцию. Использование буферных растворов является более мягким способом доведения значения pH. Буферные растворы целесообразно использовать в случаях, когда pH испытуемого препарата незначительно выходит за допустимые рамки, и когда резкий сдвиг pH исходного раствора препарата может привести к образованию осадка, разрушению активной субстанции и т.д.

Пробирки для проведения анализа. Для проведения анализа используют круглодонные пробирки из натриевого стекла. Размеры пробирок - 10x75 мм - соответствуют небольшому объему реакционной смеси (0,2 мл). Пробирки поставляются упакованными по 50 штук, что соответствует стандартному количеству определений, которое можно сделать с помощью одного флакона ЛАЛ-реактива. Пробирки депирогенизированы и могут использоваться уже без предварительной обработки. Для проведения реакции используют пробирки без крышек. Вместе с тем, пробирки с навинчивающимися крышками могут быть полезны для хранения ЛАЛ-реактива в замороженном виде. Пробирки поставляются как одноразовые. Повторное их использование не рекомендуется, т.к. в пробирках, даже однократно мытых, реакция может идти иначе, и чувствительность ЛАЛ-реактива в таких пробирках может оказаться ниже заявленной.

Пробирки для приготовления разведений. Подготовку растворов для проведения анализа проводят в пробирках диаметром 12 - 13 мм. Пробирки поставляются в упаковках по 30-40 шт. Они также депирогенизированы и могут быть использованы без предварительной обработки. В отличие от пробирок для реакции, пробирки для разведения могут использоваться многократно.

Наконечники к дозаторам. Использование одноразовых стерильных наконечников значительно упрощает процедуру анализа. Типоразмерный ряд и варианты упаковок наконечников очень разнообразны. Из этого разнообразия необходимо выбирать такие наконечники, которые соответствовали бы минимальному набору требований: они должны обеспечивать приемлемую точность дозирования и не должны быть загрязнены эндотоксинами. Наибольшая точность дозирования обеспечивается при использовании наконечников компании-производителя дозаторов. Это гарантирует максимальную совместимость дозатора и наконечника. Необходимо помнить, что дозатор и наконечник - это единый инструмент, и приводимые в проспектах данные по точности и воспроизводимости дозирования относятся не только к дозаторам, но и к наконечникам.

Содержание эндотоксинов на поверхности наконечников должно быть очень низким, однако проверяют их по этому показателю редко и в основном компании-производители ЛАЛ-реактива. Иногда встречающаяся на упаковках наконечников маркировка «апирогенный» означает, что сыв, полученный с наконечников, не вызывает пирогенную реакцию у кроликов. Прямого отношения к ЛАЛ-тесту это не имеет. Можно рекомендовать использовать для работы наконечники с маркировкой «стерильно». Квалификация «апирогенный» может рассматриваться как факультативная, поскольку она не всегда гарантирует соответствие желаемому качеству. Наконечники поставляются в штативах и в упаковке, предохраняющей от загрязнений при хранении и в процессе транспортировки. Наконечники для проведения ЛАЛ-теста должны использоваться как одноразовые.

Лабораторное оборудование

Механические дозаторы. Для подготовки растворов целесообразно пользоваться механическими дозаторами. Они обеспечивают хорошую точность и воспроизводимость дозирования, а использование одноразовых наконечников освобождает от необходимости проведения предварительной подготовки посуды. При подготовке растворов для проведения ЛАЛ-теста наиболее часто используются дозаторы следующих объемов:

- дозатор фиксированного объема на 100 мкл – используется для подготовки реакционных смесей и для приготовления разведений с шагом 1/10;
- дозатор фиксированного объема на 500 мкл - используется для приготовления разведений с шагом 1/2;

- дозатор фиксированного объема на 10 мкл - используется для приготовления положительных контролей;
- дозатор переменного объема на 100-1000 мкл - используется для приготовления разведений с разным шагом;
- дозатор переменного объема на 1-5 мл - используется для разведений ЛАЛ-реактива, КСЭ, испытуемого препарата.

Для предупреждения дефектов дозаторов и для обеспечения долговременной их эксплуатации дозаторы следует держать в вертикальном положении. Для фиксации дозаторов в правильном положении может быть использован специальный держатель-скоба, входящий в комплект поставки дозатора, который может быть прикреплен к стойке химического стола. Наиболее рациональный способ размещения дозаторов на рабочем столе включает использование карусельного штатива, предназначенного для одновременного хранения пяти дозаторов, или линейного штатива для нескольких дозаторов любого типа.

Электронные дозаторы. Для многократного дозирования одинаковых объемов очень удобными оказываются электронные дозаторы. К безусловным достоинствам электронных дозаторов можно отнести высокую точность дозирования, которая не зависит от уровня подготовки оператора. Что особенно важно, электроника проводит и постоянное самотестирование дозатора. В отличие от механических дозаторов для электронных дозаторов не требуется калибровка. Наиболее ценной особенностью электронного дозатора является возможность проведения многократного дозирования (диспенсинга). Эта функция превращает дозатор в компактный репетир. Выпускаются электронные дозаторы с разными диапазонами дозирования: от дозатора 0,2-10 мкл до дозатора 100-5000 мкл. Для подготовки к проведению ЛАЛ-теста наиболее подходящим представляется дозатор с диапазоном дозирования 50-1200 мкл.

Водяная баня. До сих пор классическим приспособлением для проведения инкубирования считается водяная баня. Водяные бани обеспечивают хорошую теплопередачу и равномерный нагрев пробирок. Еще одним преимуществом бани является возможность проведения инкубирования большого количества пробирок одновременно. Следует подбирать водяные бани объемом 8-15 л, так как большой объем воды обеспечивает стабильность температуры и в некоторой степени способен компенсировать незначительные вибрацию или сотрясения, которые могут оказаться критическими для формирующегося геля.

Баня может комплектоваться штативами для пробирок разного диаметра, в том числе и диаметром 10 мм. Конструкция штативов позволяет регулировать положение пробирок и глубину их погружения в воду. Это дает возможность проводить инкубирование маленьких пробирок при полностью заполненной емкости.

Термоблок. В термоблоке каждая пробирка нагревается индивидуально в отдельной ячейке. Одновременно инкубировать в нем большое количество пробирок невозможно, но зато он удобен в том случае, если в течение рабочего дня проводится один – два анализа. Кроме того, при использовании термоблока можно вообще обойтись без штативов для пробирок Ø 10 мм.

Вихревая мешалка. Вихревые мешалки типа «Вортекс» необходимы при приготовлении разведений раствора эндотоксина и испытуемого препарата. Согласно правилам подготовки к проведению анализа, каждый приготовленный раствор должен быть хорошо перемешан, перемешивание должно продолжаться от 3-5 до 30 секунд. При разведении лиофилизированного КСЭ перемешивание продолжается 15-30 минут. Все разведения готовят в маленьких пробирках (диаметр 12-13 мм), и в этом случае вихревые мешалки оказываются особенно полезными, поскольку встряхивание таких пробирок вручную может привести к потере раствора.

Вортексы могут комплектоваться сменными насадками, среди которых наибольший интерес представляет насадка для пробирок и флаконов. В этом случае значительно облегчается работа по разведению лиофилизированного КСЭ.

Сухожаровой шкаф. Использование одноразовой посуды и принадлежностей позволяет исключить многие подготовительные операции, но полностью исключить их не всегда удастся. Самая важная часть подготовки материалов – депирогенизация. Из всех известных способов удаления эндотоксинов наиболее доступным остается термическая депирогенизация. Естественно, этот метод применим только для материалов, выдерживающих длительное нагревание при 250°C. Сухожаровой шкаф, используемый для депирогенизации посуды, должен обеспечивать нагрев до 250°C, а желательнее и больший. Объем камеры может быть небольшим – не более 50-70 м².

pH-метр. Перед постановкой опыта целесообразно проверять значение pH испытуемого образца. Само по себе измерение pH не представляет сложности, pH-метр является стандартным лабораторным оборудованием. К сожалению, диаметр обычного электрода больше диаметра пробирок, в которых готовятся разведения или проводится реакция. Решением может быть использование вместо штатного электрода специального полумикроэлектрода. Дополнение в виде полумикроэлектрода к универсальности прибора добавляет и узкую специализацию – использование при проведении ЛАЛ-теста. Диаметр полумикроэлектрода 5 мм. Этот электрод прекрасно подходит для измерения pH растворов испытуемого препарата, которые готовят в пробирках Ø12 или Ø13 мм.

Штативы для проведения анализа. Поскольку для проведения анализа используются пробирки диаметром 10 мм, следует использовать штативы, предназначенные для таких пробирок. При подборе штативов надо иметь в виду следующее:

- количество гнезд в штативе должно быть не менее 8-10 - этого достаточно для проведения одного качественного анализа. Лучше, если количество гнезд равно 40 - 60, тогда появляется возможность проводить одновременно несколько анализов, объединяя контроли;

- конструкция штатива не должна затруднять теплопередачу (штативы в виде глухого бокса с отверстиями для пробирок могут сильно мешать передаче тепла).

В комплектацию водяных бань входят и штативы, поэтому при заказе бани лучше всего заказать и штативы, указав пробирки, для которых они будут предназначены.

Штативы для приготовления разведений. Обычные пластиковые штативы для пробирок $\varnothing 13$ мм. Можно рекомендовать использовать цветные пластиковые штативы, определив цветом назначение, например, для разведений КСЭ, разведений испытуемого препарата и т.д. Такие штативы могут быть использованы не только для приготовления разведений, но и для проведения инкубирования при отсутствии штативов для пробирок $\varnothing 10$ мм. В любом случае количество штативов должно позволять делать индивидуально разведения КСЭ и нескольких испытуемых препаратов

Парафильм. Упаковочная прозрачная пленка для лабораторного использования. Используется для укупорки вскрытых флаконов с ЛАЛ-реактивом, КСЭ, водой для ЛАЛ-теста, пробирок и флаконов с пробами и т.д. Слой пленки под покровной бумагой может считаться «апирогенным».

Электронный термометр. Для контроля температуры реакционной смеси может быть использован независимый термометр. Особенно хорошо для этой цели подходят портативные электронные термометры. Термометр может быть использован для контроля температуры во время инкубирования, причем диаметр температурного датчика позволяет измерять температуру непосредственно в пробирке $\varnothing 10$. Пробирку заполняют водой, помещают в нее электрод и ставят в баню одновременно с пробирками с реакционной смесью. Таким образом обеспечивается точный контроль за температурой реакционной смеси. Встроенные в баню или термоблок термометры показывают температуру теплоносителя, а не реакционной смеси. Это не всегда одно и то же.

Лабораторный таймер. Таймер используется для измерения времени инкубирования реакционных смесей. Обычные лабораторные таймеры имеют крупный, легко читаемый дисплей и подают звуковой сигнал по истечении времени инкубирования.

ЛАЛ-реактив Endosafe КТА.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №3 (14) 2006

Компания Endosafe заявила о себе как о производителе ЛАЛ-реактива сравнительно поздно - в конце 80^х годов. К этому моменту фарминдустрия США уже приняла метод, и требования к реактивам были в достаточной степени стандартизованы. Вновь образованная компания должна была с самого начала доказывать свою дееспособность и искать способы завоевания внимания клиентов. Надо сказать, что ей это удалось сделать. Даже поздний старт компания Endosafe сумела обратить в свою пользу. Она смогла избежать многих ошибок и учесть уже накопленный опыт применения метода. Не менее важной оказалась и установка на создание реактивов, которые бы выделялись в ряду привычных предложений.

Одним из интересных примеров такого нестандартного подхода является создание ЛАЛ-реактива Endosafe КТА. Этот реактив можно называть по-разному: и уникальным, и универсальным, и реактивом двойного (даже тройного) назначения. Реактив поставляется во флаконах на 5,0 мл и имеет ряд чувствительностей: 0,015 ЕЭ/мл, 0,03 ЕЭ/мл и 0,06 ЕЭ/мл. Несложно заметить, что это наиболее популярные фасовки и чувствительности. Действительно, по этим характеристикам реактивы Endosafe КТА мало, чем отличаются от реактивов других производителей.

Тем не менее, реактив имеет принципиальные отличия. Суть этого отличия заключается в том, что гель-тромб тестом возможности этого реактива не ограничиваются. С его помощью возможно проведение и кинетического турбидиметрического анализа. Это уже совершенно другая степень свободы.

Реактив может быть использован для проведения гель-тромб теста, соответственно, используется указанная на его этикетке чувствительность λ , например 0,03 ЕЭ/мл. И он же может быть использован для проведения кинетического анализа, при этом чувствительность метода определяется уже пользователем при построении калибровочной кривой в желаемом диапазоне, например, 0,01-1,0 ЕЭ/мл или 1-100 ЕЭ/мл. Описанная ситуация абсолютно реальна, и мы в нашей лаборатории уже привыкли к возможности свободного перехода от одного метода на другой.

Работая с этим реактивом, можно пользоваться всем спектром возможностей, которые дает кинетический анализ, и в тоже время всегда можно вернуться к хорошо известному гель-тромб тесту. Есть масса причин, по которым, начиная осваивать новый метод, нет смысла выбрасывать все, что связано со старым. При этом и освоение

нового метода становится спокойнее и безболезненнее.

Так, например, при недостатке опыта работы с кинетическим методом может возникнуть желание перепроверить результаты гель-тромб тестом по проверенной схеме. Иногда проще и быстрее поставить всего один качественный анализ в восьми пробирках.

Нет необходимости делать запасы реактивов, специально предназначенных для нового метода. Реактив, который сегодня был не использован в кинетике, завтра может быть использован в гель-тромб тесте или наоборот. Или в течение дня можно отработать программу рутинных анализов, а свободное время и остаток реактивов потратить на освоение кинетики. Надеемся, что с таким подходом согласятся многие наши коллеги, примеряющие на себя возможности кинетики и оценивающие «за» и «против». Этот реактив позволяет переходить к новому методу без безоговорочного отрицания старого.

Сегодня реактив Endosafe КТА является «мостом», по которому можно перейти на новые методы проведения анализа. Действительно, приобретение специального оборудования и программного обеспечения для кинетических анализов не означает, что надо выбрасывать ставшую привычной баню или термоблок и отказаться от приобретенного трудом и ошибками опыта. Оба метода, старый и новый, могут долго существовать параллельно и, самое важное, они могут проводиться с помощью одного реактива. Так, с реактивом Endosafe КТА период освоения кинетического метода может пройти комфортно.

Со временем, в случае осознанного и полного отказа от гель-тромб теста, можно будет работать с реактивом КТА2, характеристики которого в кинетическом анализе выше, чем у КТА (главным образом, это касается более широкого диапазона измерений). Очень важно, что в части кинетического турбидиметрического анализа переход с реактива Endosafe КТА на Endosafe КТА2 не требует проведения ревалидации.

Возможность использования одного реактива для проведения разных анализов имеет некоторые технические особенности, которые нельзя назвать ограничениями, но с которыми приходится считаться.

В основном особенности касаются активности КСЭ. Пара ЛАЛ-реактив / КСЭ сопровождается двумя Сертификатами Анализа. В одном из них указывается активность КСЭ в гель-тромб тесте, указана и чувствительность ЛАЛ-реактива (значение λ , указанное на этикетке).

Во втором сертификате чувствительность ЛАЛ-реактива вообще не упоминается. Она может быть любой, в зависимости от построенной калибровочной кривой.

Активность того же флакона КСЭ в кинетическом анализе может оказаться иной, чем в гель-тромб тесте. И хотя это известный факт, первоначально трудно привыкнуть к тому, что для одной и той же серии ЛАЛ-реактива могут быть указаны разные значения активности КСЭ.

Дело осложняется тем, что флакон с КСЭ для гель-тромб теста обычно разводится водой до получения исходного раствора с концентрацией, равной 20 ЕЭ/мл (стандартная концентрация). А в кинетическом анализе, с учетом того, что калибровочная кривая может быть построена для участка концентраций, например, от 0,5 до 50 ЕЭ/мл, исходный раствор должен иметь концентрацию, как минимум, 50 ЕЭ/мл. Следовательно, флакон с КСЭ надо разводить другим объемом воды и при этом учитывать специфику его активности в кинетическом анализе. Вывод: один и тот же раствор КСЭ не может быть использован в обоих анализах, и для работы двумя методами надо иметь, как минимум, два флакона с исходным раствором КСЭ: один для гель-тромб теста, другой - для кинетического турбидиметрического теста. Это неизбежная плата за универсальность ЛАЛ-реактива. Тем не менее, это удобнее, чем одновременно работать с разными наборами различных реактивов, отслеживать их сроки хранения, остатки и пр. Два флакона КСЭ с разной исходной концентрацией не сильно усложняют работу.

В заключение необходимо отметить другие характеристики реактива Endosafe, которые могут показаться полезными.

Реактив содержит буфер, это не является уникальным явлением, но как показывает практика, забуференные реактивы в меньшей степени подвержены ингибированию со стороны испытуемого препарата. Такие реактивы позволяют проверять препараты, обходясь одним только разведением их водой, что является наиболее предпочтительным. Буферная емкость ЛАЛ-реактива Endosafe достаточно велика, например, этот реактив позволяет проверять основные растворы с щелочностью, эквивалентной 0,01 N NaOH, без какой-либо их специальной нейтрализацией.

Отдельно стоит остановиться на такой характеристике, как свойства или качество геля. Если в реакционной смеси присутствует эндотоксин, гель, образующийся в этом случае, получается ярко выраженным, очень четким и устойчивым. Он хорошо держится на дне пробирки, и даже до ее переворачивания однозначно интерпретируется как гель. Конечно, при встряхивании пробирки этот гель, как и любой другой, разрушается. Но по единодушному мнению специалистов, работавших с этим реактивом, в части оценки результатов Endosafe КТА оставляет мало места для промежуточных или нечетких оценок.

Заключение. За четыре года практической работы мы имели возможность опробовать реактивы всех производителей. Работа с каждым из них имеет свою специфику. Но, по нашим наблюдениям, свойства, характеристики и спектр возможного применения ЛАЛ-реактива Endosafe КТА делают этот реактив наиболее универсальным.

К вопросу о расходных материалах, используемых при проведении анализа.

Демидова В.В., Ситников А. Г.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №3(10) 2005

Проведение анализа невозможно без таких простых вещей, как пробирки, планшеты, пипетки и т.д. Даже к таким компонентам предъявляются определенные требования. У этих требований есть вполне обоснованная теоретическая база, подкрепленная практическим опытом.

Если попытаться классифицировать проблемы, которые могут возникнуть при использовании лабораторной посуды, то их можно разделить на три группы:

- Слишком высокое «фоновое» содержание эндотоксина на поверхности;
- Вымывание компонентов, способных оказывать влияние на ход реакции;
- Адсорбирование эндотоксина на поверхности используемого изделия.

Стоит разобрать каждую из этих проблем подробно.

Использование посуды с высоким содержанием эндотоксинов может привести к получению ложноположительных результатов. Такие результаты хорошо идентифицируются по положительной реакции в отрицательном контроле. К счастью, такие случаи редки. Производство (формовка, выдувание) пластиковой посуды происходит при высоких температурах, разрушающих эндотоксины. Если готовая посуда упаковывается в чистых условиях и затем стерилизуется, риск вторичной контаминации минимален. Стекланную посуду можно депирогенизировать в упакованном виде, что сводит риск присутствия эндотоксинов на ее поверхности к нулю.

Следующая проблема – вымывание компонентов, способных ингибировать реакцию. Главным образом, это касается пластиковой посуды. Самым проблемным материалом считается полипропилен, смывы с которого способны ингибировать реакцию. Материалы из полистирола, напротив, не оказывают никакого влияния на ход реакции. Поэтому контейнеры из полистирола часто рекомендуют использовать для хранения

испытуемых образцов, а планшеты из полистирола широко используются для проведения хромогенных и турбидиметрических анализов.

Наконец, проблема адсорбции эндотоксина на поверхности изделия тоже достаточно серьезна и зависит от природы используемого материала. Адсорбция может быть необратимой, и в этом случае никакое перемешивание уже не способно вернуть эндотоксины в раствор. Это явление может приводить к серьезным изменениям концентрации используемых растворов КСЭ, тогда по результатам опыта делаются ошибочные выводы об «ингибировании реакции» или о потере активности ЛАЛ-реактива. Хуже всего дело обстоит с изделиями из полипропилена и полиэтилена, с которыми эндотоксин связывается необратимо и в больших количествах. В значительной степени адсорбируется эндотоксин и на поверхности боросиликатного и натриевого стекла. В наименьшей степени – на поверхности полистирола. Ко всему сказанному следует добавить еще и то, что степень адсорбции эндотоксина зависит от его концентрации. Чем выше исходная концентрация, тем менее заметны потери, связанные с адсорбцией, и наоборот, чем ниже концентрация эндотоксина, тем заметнее потери, вызванные его адсорбцией на поверхности пробирок. Именно поэтому во всех инструкциях по обращению с КСЭ указывается, что рабочие разведения эндотоксина нельзя долго хранить.

Оценивая совместимость разных материалов с ЛАЛ-тестом, можно сделать некоторые общие выводы. Наиболее подходящими являются контейнеры (пробирки, флаконы) из стекла. Предпочтение отдается нейтральному боросиликатному стеклу. Единственное исключение: для проведения анализа традиционно используются пробирки размером 10x75 мм из натриевого стекла. Из широкого спектра пластиковой посуды наиболее подходят изделия из полистирола. Использование полипропиленовых или полиэтиленовых контейнеров крайне нежелательно. Исключение составляют наконечники для пипеток. В целом, пластиковая посуда используется в ЛАЛ-тесте очень ограничено. Пожалуй, наибольшей проблемой пластиковой посуды является значительная зависимость от свойств конкретного состава, используемых наполнителей, пластификаторов и т.д. И, как следствие этого, разные партии материалов даже одного и того же производителя могут по-разному вести себя в анализе. Это также относится и к пробиркам из стекла, хотя и в меньшей степени.

Из всего сказанного можно сделать простой вывод: к подбору пробирок, контейнеров, пипеток и наконечников надо относиться серьезно. Перед использованием в

ЛАЛ-тесте новых материалов следует проводить их предварительную проверку и, если необходимо, валидировать используемые материалы. В большинстве случаев эту работу делают производители ЛАЛ-реактива, и неслучайно на многие вспомогательные компоненты наносится маркировка **«для ЛАЛ-теста»**. Это означает, что материалы прошли специальное тестирование на совместимость со всеми основными компонентами тест-системы до выпуска на реализацию. Вместе с тем, не стоит слишком серьезно относиться к маркировке «апирогенно» и «стерильно». Стерильность означает отсутствие жизнеспособных организмов, но отнюдь не означает отсутствия фрагментов клеточных стенок – эндотоксинов. Апирогенность изделия отражает безопасность его для человека, но допустимые нормы содержания эндотоксинов (обычно 20 ЕЭ/изделие) не приемлемы для ЛАЛ-теста. К сожалению, изделия со специальной маркировкой не всегда бывают доступны. Практика работы показывает, что часто наличие только одной маркировки «стерильно» на герметичной упаковке, например, с наконечниками для дозаторов, оказывается вполне достаточно. Правда с наконечниками и по другим параметрам оказывается менее всего проблем, поскольку у них контакт с растворами минимальный.

Нельзя не затронуть и еще одну, «больную» тему. Подразумевается, что все эти пробирки, пипетки и т.д. используются однократно. Сразу оговоримся, что пристрастие к одноразовым вещам, столь характерное для западной промышленности, просматривается и в отношении к вспомогательным материалам, используемым для проведения ЛАЛ-теста. Действительно, за рубежом уже давно считается, что проще выбросить использованный предмет, чем тратить время на приведение его в порядок. Мы не собираемся давать оценки такому подходу, заметим только, что в области, связанной с материалами для ЛАЛ-теста, целесообразность одноразового использования посуды имеет более глубокое обоснование.

Любая обработка приводит к изменению физических и химических свойств изделий. Часто исключена и возможность проведения финишной депирогенизации изделий после мойки. Действительно, пластиковая посуда не может быть подвергнута термической депирогенизации и, следовательно, невозможно гарантировать отсутствие эндотоксинов на ее поверхности после мойки. Стекло можно легко депирогенизовать, но мыть их не рекомендуют (за исключением пробирок для разведений). Следовые количества моющих средств могут оказывать ингибирующее действие на реакцию. Механическая обработка, например, ершование, приводит к сглаживанию микроскопических

шероховатостей поверхности, которые являются центрами кристаллизации для формирующегося геля. В результате, первоначальные свойства материала могут быть изменены. Изменения эти могут быть значительны, а могут быть совершенно безобидными. Но даже незначительные изменения будут накапливаться по мере повторения циклов обработки. На каком этапе произойдет качественное изменение неизвестно. Неизвестно и какой будет картина опыта, в котором используются пробирки, прошедшие разное количество циклов обработки. Фактически, это уже другие пробирки, к тому же не прошедшие предварительной проверки. Интерпретация результатов опыта становится невозможной, как и невозможно понять причину ошибок (кроме той, которая лежит на поверхности).

Литература.

1. Novitsky TJ, Schmidt-Gengenbach J, Remillard JF *Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces J Parenter Sci Technol 1986 Nov;40(6):284-286*
2. *Factors affectig the recovery of endotoxin LAL Update, 1992, Vol.10.,No.1*
3. Legg C, NovitskyT. *Comparison of Glass and Plastic Microplates in Kinetic LAL Assays LAL Update 2001 Vol. 19.,No.1*
4. Fife L.A., Dawson M.E *Laboratory disposables and the LAL test LAL Update 2005 Vol 22, No. 1*
5. *The problems with plastics LAL Update 1998 Vol.6., No. 3*
6. *Glitches with glass LAL Update, 1991, Vol.9.,No.2*
7. *Endotoxin and storage containers Endosafe times 2004., Vol.11.No.*

Использование механических дозаторов при проведении ЛАЛ-теста.

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №2 (7) 2004

При проведении ЛАЛ-теста значительная часть работ по подготовке к анализу сводится к приготовлению разведений испытуемого препарата. Соответственно при организации рабочего места следует уделять внимание и инструментам, необходимым для данной операции. Лет десять – пятнадцать назад для такой работы использовались исключительно стеклянные пипетки. Отдавая дань уважения этому заслуженному инструменту, нельзя не заметить, что сегодня стандартом стали механические дозаторы, а им на смену уже идет новое поколение – электронные дозаторы.

По сравнению с обычными стеклянными пипетками точность и воспроизводимость результатов дозирования механических

дозаторов значительно выше и в меньшей степени зависят от подготовки аналитика. Использование одноразовых наконечников освобождает от необходимости проведения предварительной подготовки посуды – мойки и депирогенизации. В общем, механические дозаторы очень удобны и сегодня являются стандартным оборудованием любой лаборатории. Проблемой часто оказывается то, что моделей и типов дозаторов много, и из большого ассортимента бывает трудно выбрать то, что нужно для работы. В этой статье мы попытались обобщить собственный опыт использования механических дозаторов и предложить не столько готовые решения, сколько поделиться рассуждениями, на основании которых принимались эти решения.

Прежде чем перейти к рекомендациям, следует обратить внимание на некоторые распространенные заблуждения и устойчивые стереотипы, связанные со специфичностью ЛАЛ-теста. Отправная точка таких рассуждений всегда одинакова – ЛАЛ-тест «особенный анализ», следовательно для его проведения нужны особенные дозаторы и наконечники. В известной степени это верно, как верно и то, что любой анализ обладает своими специфическими особенностями. Выводы же, сделанные из отправного тезиса, оказываются скорее вредными, чем полезными. Обычно упор делается на то, что дозаторы должны быть автоклавируемы, а наконечники обязательно должны быть с интегрированными фильтрами. В действительности оба эти качества следует рассматривать в лучшем случае как факультативные. Так, возможность автоклавирования дозаторов, безусловно, важная для микробиологов и специалистов, работающих с биологически активными жидкостями, при проведении ЛАЛ-теста совершенно необязательна. При работе с дозатором достаточно аккуратного обращения и периодической обработки его дезинфицирующими растворами. Автоклавирование требует более частого осмотра и профилактического обслуживания дозатора, без которых невозможно обеспечение точности дозирования. Аналогична ситуация и с наконечниками с интегрированными фильтрами. Такие фильтры нужны только в том случае, если необходимо защитить поршневую систему дозатора от летучих или агрессивных веществ, для защиты от попадания биологически активных или опасных жидкостей, для предупреждения перекрестной контаминации дозируемых жидкостей. При постановке ЛАЛ-теста такая специальная защита необязательна (если этого не требуют свойства исследуемого препарата). Вполне достаточно стандартных сменных фильтров, вставляемых в посадочный конус дозаторов.

В то же время нельзя не согласиться и с тем, что подготовка растворов для проведения ЛАЛ-теста имеет свою специфику, и ее надо

учитывать при комплектации набора дозаторов. Можно выделить наиболее характерные детали:

- Все работы связаны с довольно узким диапазоном рабочих объемов от 100 мкл до 1000 мкл;
- В этом диапазоне мкл есть часто используемые объемы. Среди них наиболее часто приходится дозировать объемы, равные 100 мкл, при подготовке реакционных смесей и при разведении с шагом 1/10. Очень распространенным объемом при подготовке разведений является объем, равный 500 мкл, используемый для подготовки разведений с шагом 1/2;
- Есть редкие исключения: иногда приходится дозировать объемы больше 1 мл, и может возникнуть необходимость в точном отборе очень маленького объема (10 мкл).

Если в лаборатории проводится небольшое количество опытов, то можно обойтись одним дозатором переменного объема, перекрывающим весь рабочий диапазон дозирования (100 – 1000 мкл). При систематической работе гораздо удобнее использовать несколько дозаторов. Набор можно формировать вокруг дозатора переменного объема, добавив к нему дозаторы, рассчитанные на дозирование наиболее распространенных объемов – 100 мкл и 500 мкл. Использование дозаторов фиксированного объема не только очень удобно, но и позволяет снизить риск ошибки – случайной или системной.

Поскольку время от времени возникает необходимость в разведении лиофилизированных ЛАЛ-реактива и КСЭ, а также в разведении сухих или лиофилизированных испытуемых препаратов, полезным может оказаться дозатор, рассчитанный на дозирование больших объемов. Например, дозатор переменного объема на 1000-5000 мкл. Если такая необходимость возникает не часто, то можно вполне обойтись и стеклянными пипетками на 5 мл.

Наконец, стоит сказать еще об одном часто используемом объеме – 10 мкл. Это объем раствора КСЭ, который добавляется в реакционную смесь, для получения нужной концентрации эндотоксина в положительном контроле. Такой способ подготовки положительного контроля требует определенного навыка, но освоив его, можно значительно упростить процедуру подготовки опыта. Поскольку добавляется очень маленькое количество раствора КСЭ, а точность дозирования должна быть высокой, мы рекомендуем для этого приема использовать специальный дозатор фиксированного объема на 10 мкл.

Если резюмировать сказанное, то получится следующий перечень дозаторов, необходимых при подготовке к проведению анализа:

- Дозатор фиксированного объема на 100 мкл – используется для подготовки реакционных смесей и для приготовления разведений с шагом 1/10;
- Дозатор фиксированного объема на 500 мкл – используется для приготовления разведений с шагом 1/2;
- Дозатор фиксированного объема на 10 мкл – используется для приготовления положительных контролей;
- Дозатор переменного объема на 100-1000 мкл (200-1000 мкл) – используется для приготовления разведений с разным шагом;
- Дозатор переменного объема на 1000-5000 мкл – используется для разведений ЛАЛ-реактива, КСЭ, испытуемого препарата.

Поскольку корпуса дозаторов внешне абсолютно одинаковы, целесообразно вводить их цветовую маркировку. В комплектацию дозаторов входят цветные колпачки, которыми можно маркировать дозаторы в соответствии с назначением. Такая цветовая маркировка значительно облегчает повседневную работу. И последнее, комплект из 4-5 дозаторов лучше всего хранить на специальном штативе- карусели.

Обзор дозаторов будет неполным без краткого описания наконечников, которые будут с ними использоваться. К подбору наконечников надо относиться достаточно серьезно. Может быть стоит сначала выбирать именно подходящие наконечники, оценивая их по показателям цена/качество. Действительно, покупка дозаторов – это разовая процедура, а покупка расходных материалов – процедура постоянная. Совокупная же стоимость расходных материалов может во много раз превышать стоимость инструментов, с которыми они используются. Стоит помнить и еще одну важную деталь – лучше использовать дозаторы и наконечники одного производителя, т.к. дозатор и наконечник являются единой системой, и использование наконечников сторонних производителей может привести к серьезным нарушениям точности дозирования.

Вопрос качества наконечников уже поднимался в одном из номеров нашего бюллетеня («ЛАЛ-тест» №2, 2003 г). Стоит еще раз обратить внимание на то, что наконечники должны быть как минимум стерильными. Маркировка «апиrogenный» может быть желательна, но она не гарантирует однозначной пригодности

наконечников для ЛАЛ-теста. К сожалению, тестируют наконечники на их возможность использования при проведении ЛАЛ-теста только производители ЛАЛ-реактива.

Определенных рекомендаций по выбору торговой марки дать довольно сложно, поскольку невозможно выделить какую-то одну компанию, назвав ее самой лучшей. Во многом такой выбор определяется прежним опытом работы, уже имеющимися в лаборатории дозаторами, наконец, внешней привлекательностью или стоимостью, иными словами - делом вкуса и экономических возможностей предприятия. Повторим только, что выбирая торговую марку, надо выбирать одновременно и дозаторы, и наконечники.

Пластиковые наконечники для автоматических пипеток.

Г.В.Долгова

Бюллетень «ЛАЛ-тест» №1 (2) 2003

Использование автоматических дозаторов при проведении ЛАЛ-теста стало уже нормой. Актуальным при этом является вопрос подбора пластиковых наконечников. Первый вопрос, который стоит перед пользователем – совместимость наконечников и посадочных конусов автоматических дозаторов. Проще всего он решается при использовании дозаторов и наконечников одного производителя.

Более важный вопрос – качество наконечников. В ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины» требования к качеству используемого в методе оборудования определены следующим образом: «используемые в тесте посуда и материалы должны быть стерильны и не должны содержать бактериальных эндотоксинов в количествах, определяемых в данном тесте». Для пластиковой посуды сформулировано еще одно дополнительное требование – она не должна оказывать влияния на ход реакции (1). Последнее требование касается возможной адсорбции эндотоксинов на поверхности пластиковой посуды. Качество пластиковых наконечников определяют два важных показателя – стерильность и отсутствие бактериальных эндотоксинов. В этих вопросах пользователь вынужден ориентироваться на квалификацию наконечников, указанную производителем. Считается, что маркировка «Стерильные» и «апиригенные» это то, что нужно для работы. Если со стерильностью все однозначно и понятно, то «апиригенность» может ввести в заблуждение. Дело в том, что производители, маркирующие свою продукцию, таким образом, проверяют ее методами, принятыми для проверки апиригенности изделий медицинского назначения. Эти требования сформулированы в Фармакопее США и в

требованиях FDA по валидации ЛАЛ-теста (2,3). Предельное содержание бактериальных эндотоксинов на поверхности одного изделия не должно превышать 20 ЕЭ. Методика проверки представляет собой определение концентрации бактериальных эндотоксинов в смыве с изделия. Очевидно, что, если даже 1/10 из разрешенных 20 ЕЭ на одно изделие перейдет в аликвоту воды, взятой таким наконечником, это будет означать неизбежное гелирование любого ЛАЛ-реактива. Из этого следует, что квалификация «апиригенный» для наконечников не гарантирует их качества при использовании в ЛАЛ-тесте. Важным может быть то, что эта квалификация косвенно свидетельствует о более высоких требованиях, предъявляемых к производству и упаковке наконечников.

Точное определение квалификации наконечников – «для ЛАЛ-теста», (так же как и квалификация воды – «вода для ЛАЛ-теста»). Такую квалификацию присваивают наконечникам только фирмы поставщики ЛАЛ-реактива, которые хорошо понимают суть проблемы (4).

Следовательно, при выборе наконечников необходимо обращать внимание на следующие показатели:

1. Указание на стерильность;
2. Способ упаковки – упаковка должна быть герметична.
3. Маркировка «апиригенный» может прибавить уверенности в качестве, но однозначно не гарантирует его.

Главный вывод: оценка квалификации должна быть проведена перед использованием в ЛАЛ-тесте. Оправдано применение метода приготовления смывов или погружения наконечников в определенный объем воды для ЛАЛ-теста с последующей инкубацией при 37°С. Приемлемая концентрация бактериальных эндотоксинов в смыве должна быть ниже 0,03 ЕЭ/наконечник. Такая чувствительность доступна для геле-тромб теста. Если в объем V погружено N наконечников, то это означает, что содержание БЭ на поверхности одного изделия, составит $V \times T / N$ [ЕЭ/мл], где T – концентрация БЭ в растворе. В процессе проведения этого испытания выясняют также наличие мешающих факторов у пластика.

Можно пытаться оценить качество по косвенным показателям: отсутствие видимых изменений в отрицательном контроле, однозначные результаты для всех повторностей в тесте «Подтверждение заявленной чувствительности» и в других анализах.

Вообще пластиковые изделия, должным образом упакованные, как правило, апиригенны. Возможно, было бы целесообразно, составить список уже проверенных де-факто наконечников с указанием названия компании-производителя

и каталожного номера изделия. Это значительно облегчило бы проблему выбора для исследователей, только начинающих свою работу. В следующих номерах мы планируем начать публиковать перечень проверенной нами продукции. Приглашаем и Вас, наших подписчиков, принять участие в этом процессе.

Литература.

1. ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины».
2. «*Transfusion and infusion Assembles and similar medical devises*»

//<161> *The United States Pharmacopoeia, 24-th Ed., 1999.*

3. "Guideline on validation of the *Limulus ameobocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices*". // U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.

4. Berzofsky R.N. "Screening LAL accessories"//LAL Review. Published by BioWhittaker. Inc. Summer 2000

ПРИЛОЖЕНИЯ

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Пирогены	<i>Вещества, попадание которых в организм человека вызывает повышение температуры тела. Термин, как правило, применяется в отношении случайных примесей, загрязняющих растворы инъекционных лекарственных средств. Наиболее часто встречающиеся пирогены – эндотоксины грамотрицательных бактерий.</i>
Бактериальные эндотоксины	<i>Фрагменты клеточной оболочки грамотрицательных бактерий. Представляют собой белково-липополисахаридные комплексы разного размера и молекулярной массы. Молекулы бактериальных эндотоксинов устойчивы к нагреванию и не разрушаются при обычном цикле автоклавирования. Легко проходят через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Они, оставаясь в растворе стерильного лекарственного средства, способны вызывать пирогенную реакцию.</i>
Липополисахариды, ЛПС	<i>Высокоочищенные молекулы бактериальных эндотоксинов, лишенные белковой части. Молекула липополисахарида состоит из трех частей: гидрофильного о-полисахарида, ядра и биологически активного гидрофобного Липида А. Пирогенные свойства ЛПС определяются именно липидной частью молекулы. Стандарты эндотоксина, используемые при проведении ЛАЛ-теста, по своей химической природе являются липополисахаридами.</i>
Международный стандарт эндотоксина	<i>Стандарт эндотоксина, признанный Экспертным Комитетом по биологической стандартизации ВОЗ, является очищенным эндотоксином (липополисахаридом, ЛПС) <i>Escherichia coli</i> штамма 0113:H10:K0. В одном флаконе содержится 10000 единиц эндотоксина (ЕЭ). Международный стандарт служит для калибровки контрольных стандартов эндотоксина, выпускаемых национальными производителями различных стран, а также для установления чувствительности выпускаемых ЛАЛ-реактивов.</i>
Единица эндотоксина, ЕЭ	<i>Единица активности Международного стандарта эндотоксина. В единицах эндотоксина выражается чувствительность ЛАЛ-реактива (ЕЭ/мл), а также пороговая пирогенная доза и предельное содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственном средстве.</i>
Пороговая пирогенная доза	<i>Доза эндотоксина, введение которой способно вызвать пирогенную реакцию у человека, выраженная в единицах активности Международного стандарта эндотоксина (ЕЭ). На основании многочисленных экспериментов принято считать эту дозу, равной 5 ЕЭ/кг в час при введении лекарственного средства парентерально и 0,2 ЕЭ/кг в час при интратекальном способе введения. Значение пороговой пирогенной дозы используется при расчете предельного содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственном средстве.</i>
Предельное содержание бактериальных эндотоксинов	<i>Содержание (концентрация) бактериальных эндотоксинов в препарате, которое не вызывает пирогенной реакции при введении этого препарата в максимальной терапевтической дозе. Эта величина может быть выражена в ЕЭ на 1 мг или 1 мл препарата (ЕЭ/мл, ЕЭ/мг), в ЕЭ на 1 единицу активного вещества (ЕЭ/ЕД) или в ЕЭ на дозу. Учитывая специфику анализа и то, что предельное содержание бактериальных эндотоксинов рассчитывается исходя из пороговой пирогенной дозы, реальное содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственном средстве, определенное с помощью ЛАЛ-теста, должно быть меньше предельного содержания бактериальных эндотоксинов.</i>
ЛАЛ-реактив	<i>Реактив, получаемый из клеток крови (амебоцитов) мечехвостов (<i>Limulus polyphemus</i>). Аббревиатура «ЛАЛ» - сокращение, образованное первыми буквами словосочетания «Лизат Амебоцитов Лимулюс». ЛАЛ-реактив – это лиофилизированный лизат амебоцитов, забуференный и стабилизированный.</i>
ЛАЛ-тест	<i>Это тест, в котором используется ЛАЛ-реактив. Он предназначен для определения содержания бактериальных эндотоксинов в водных растворах. ЛАЛ-тест может выполняться в различных модификациях: гель-тромб тест, хромогенный или турбодиметрический.</i>
Гель-тромб тест	<i>Способ проведения ЛАЛ-теста, в котором конечный результат реакции оценивается визуально по образованию плотного геля на дне пробирки</i>

после завершения инкубирования реакционной смеси. Гель-тромб тест является основным методом проведения ЛАЛ-теста, принятым ведущими фармакопеями мира.

Качественный гель-тромб тест

Самый простой и распространенный способ проведения гель-тромб теста, по результатам которого можно сделать вывод о том, что концентрация бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате меньше установленного для данного препарата предельного содержания бактериальных эндотоксинов. Этот тест также называется «разрешающим» или «разрешающим/запрещающим». В Европейской фармакопее и Фармакопее США он указан, как Метод А и является арбитражным методом.

Количественный гель-тромб тест

Способ проведения эксперимента, который дает возможность определения концентрации эндотоксина в анализируемом препарате путем испытания серии его последовательных разведений. Концентрация эндотоксина рассчитывается путем умножения чувствительности используемого ЛАЛ-реактива на фактор максимального разведения препарата, в котором был получен плотный гель. Этот тест иногда называют полуколичественным, из-за невозможности точно определить истинное значение концентрации бактериальных эндотоксинов.

Заявленная чувствительность реактива (λ)

ЛАЛ-

Чувствительность ЛАЛ реактива (λ), указанная на этикетке флакона, соответствует минимальной концентрации Международного стандарта эндотоксина (выраженной в ЕЭ/мл), способной вызвать гелирование данного ЛАЛ-реактива в том методе проведения анализа, для которого этот реактив предназначен.

Максимально Допустимое Разведение, МДР

Максимальное разведение испытуемого препарата, при котором еще возможно получение значимых, с точки зрения контроля качества лекарственного средства, результатов. Степень разведения зависит от предельного содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате и чувствительности используемого в опыте ЛАЛ-реактива.

Вода для ЛАЛ-теста

Вода, соответствующая качеству воды для инъекций, содержание бактериальных эндотоксинов в которой меньше определяемого в тесте уровня. Используется для приготовления разведений ЛАЛ-реактива, Контрольного стандарта эндотоксина и испытуемого препарата.

Плотный гель

Плотный гель, который не разрушается при аккуратном однократном переворачивании пробирки на 180°.

Положительная реакция, положительный результат

Образование плотного геля в реакционной смеси ЛАЛ-реактив + испытуемый препарат, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180°. Является характеристикой одного определения (результат для одной пробирки), не означает прохождения испытуемым препаратом теста «Бактериальные эндотоксины».

Отрицательный результат, отрицательная реакция

Отсутствие геля в реакционной смеси или образование геля, который разрушается при переворачивании пробирки на 180°. Также является характеристикой одного определения и не означает несоответствия испытуемого препарата требованиям нормативной документации.

Отрицательный контроль

Представляет собой реакционную смесь – ЛАЛ-реактив + Вода для ЛАЛ-теста. Ставится для каждого инкубирования. Может быть один для нескольких анализов, проводимых одновременно при одних и тех же условиях (в одной водяной бане). Подтверждает соблюдение мер асептики при подготовке и проведении анализа. Обычно ставится в двух повторностях. Результаты должны быть отрицательными.

Положительный контроль

Представляет собой реакционную смесь ЛАЛ-реактив + раствор контрольного стандарта эндотоксина в концентрации, гарантирующей образование плотного геля (2λ). Ставится в двух повторностях. Проводится для каждого анализа (инкубирования). Подтверждает работоспособность ЛАЛ-реактива в условиях анализа. Результаты должны быть положительными. При проведении количественного гель-тромб теста положительный контроль представляет собой серию разведений контрольного стандарта эндотоксина в концентрациях 2λ, λ, 0,5λ и 0,25λ. Служит для подтверждения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива в условиях опыта.

**Положительный контроль
испытуемого образца**

Представляет собой испытуемый препарат в выбранном для анализа разведении, к которому добавлен раствор эндотоксина в концентрации, гарантирующей образование твердого геля (2λ). Необходим для демонстрации того, что в условиях анализа препарат не ингибирует реакцию ЛАЛ-реактива и эндотоксина. Ставится в двукратной повторности. Результат должен быть положительным.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БЭ	<i>Бактериальные эндотоксины</i>
ЕЭ	<i>Единица эндотоксина</i>
КСЭ	<i>Контрольный стандарт эндотоксина</i>
МС (МС-2)	<i>Международный стандарт эндотоксина.</i>
λ	<i>(лямбда) – чувствительность ЛАЛ-реактива, выраженная в ЕЭ/мл</i>
МДР	<i>Максимально допустимое разведение</i>
ОФС 42-0002-00	<i>ОФС 42.0002-00 «Бактериальные эндотоксины»</i>
МНН	<i>Международное непатентованное название лекарственного средства</i>
ФС	<i>Фармакопейная статья</i>
ФСП	<i>Фармакопейная статья предприятия</i>
НД	<i>Нормативная документация</i>
ЛС	<i>Лекарственное средство</i>

Среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина, определенное в опыте

Тутнова А.Д., Демидова В.В., Ситников А.Г.

Бюллетень «ЛАЛ-Тест» №2 (17) 2007

Расчет среднего геометрического значения концентрации эндотоксина, как правило, представляет собой техническую и во многом формальную задачу. Так как мы, работающие с ЛАЛ-тестом, довольно далеки от математики, то вопрос таких расчетов, особенно получения значения антилогарифма, может оказаться проблемой. Конечно, решение найти можно всегда. В качестве примера можно привести весьма нетривиальный способ решения, оказавшийся очень простым и не менее эффективным. Пример реальный. Сотрудники спрашивают: как считать? Начальник снимает трубку и звонит на мехмат городского университета. Далее следует примерно следующий диалог:

- Ребята, можете объяснить, как рассчитать антилогарифм с помощью инженерного калькулятора?

- Наверное, сможем, посмотреть надо. Ага, там надо циферки сначала ввести, потом нажать такую-то комбинацию клавиш одновременно. Получится антилогарифм. Так, кажется...

- Спасибо, выручили.

Вариант решения, наверное, самый простой. Но даже если рядом нет мехмата, почти всегда в лаборатории есть компьютер, а на нем стоит пакет MSOffice, непременным компонентом которого является электронная таблица MSExcel. Вот в этой программе и можно не только рассчитать среднее геометрическое значение, но и сделать один раз шаблон такого расчета и затем просто менять в нем цифры - значения концентрации эндотоксина. Остальные расчеты будут выполняться программой автоматически, по введенным в соответствующие ячейки формулам. Мы пользуемся примерно следующим шаблоном:

Пример расчета среднего геометрического значения в MSExcel

Координаты ячеек	A	D	C
1	Повторности (f)	Концентрация эндотоксина, ЕЭ/мл	Логарифм концентрации (e)
2	1	0,03	-1,5229
3	2	0,015	-1,8239
4	Сумма логарифмов (Σe)		-3,3468
5	Среднее значение логарифмов		-1,6734
6	Антилогарифм среднего значения логарифмов		0,0212

Пояснения к таблице:

Адрес ячейки	Содержание ячейки	Формула в ячейке	в
D2 и D3	Значения концентрации БЭ, определенные для каждой из повторностей	Формулы нет. В ячейки вводятся только цифры, разделитель - запятая.	
C2	Расчет значения логарифма для повторности	=LOG10(D2)	
C3	Расчет значения логарифма для повторности	=LOG10(D3)	
C4	Расчет суммы логарифмов	=СУММ(C2:C3)	
C5	Расчет среднего значения логарифмов	=C4/2	
C6	Расчет значения антилогарифма	=10^(C5)	

Примечания:

1. Общее правило введения формул в ячейку: знак «=» - начало введения формулы, далее идут ее аргументы. Это могут быть цифры, формулы, адреса ячеек. Адрес ячейки представляет собой ее цифробуквенное обозначение, взятое в круглые скобки.
2. Расчет антилогарифма - действие, обратное логарифмированию. Последняя операция - это возведение десяти (основание логарифма) в степень, соответствующую среднему значению логарифмов (ячейка C5). (Знак возведения в степень (^) находится в верхнем ряду клавиатуры на клавише с цифрой «6». Английская раскладка клавиатуры, верхний регистр).
3. Пересчет по всем формулам делается автоматически после изменения значений в ячейках D2 или D3 и нажатия Enter.
4. Количество знаков после запятой в ячейках с формулами можно ограничить 2-3 знаками (см. команды или кнопки «Увеличить разрядность» и «Уменьшить разрядность» в главном меню программы).

Этот шаблон сделан для расчета результатов количественных анализов, в которых количество повторностей - две. Если надо рассчитать среднее значение, полученное в опыте «Подтверждение заявленной чувствительности», то можно сделать аналогичный шаблон, добавив к нему еще две строки для данных по содержанию эндотоксинов в третьей и четвертой повторностях. Соответственно, суммировать значения надо будет уже по четырем ячейкам, и делить полученное значение на четыре.

Вот собственно и все. Надеемся, что это несложное объяснение поможет вам в вашей работе.

СЕРТИФИКАТ КСЭ

Материалы Семинара «Проведение контрольных анализов в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины»

В качестве Контрольного Стандарта Эндотоксина (КСЭ) при проведении ЛАЛ-теста, как правило, используются высокоочищенные препараты, полученные из E.Coli (обычно штаммов 0113:H10 или 055:B5). Во флаконе КСЭ содержится определенное количество лиофилизированного ЛПС, обычно 10 нг. Средняя активность этих препаратов составляет 10 ЕЭ/нг, но с каждой конкретной серией ЛАЛ-реактива она может быть немного больше или немного меньше. Для каждой серии ЛАЛ-реактива производитель проверяет эту активность по Международному Стандарту Эндотоксина и указывает ее значение в Сертификате Активности. Часть производителей считает, что если активность находится в диапазоне 5 ЕЭ/нг -15 ЕЭ/нг, значение может быть округлено до 10 ЕЭ/нг. Соответственно, для подготовки исходного раствора КСЭ требуются одинаковые объемы воды - 5 мл. Другие, напротив, считают, что надо указывать реальное значение активности. Так, если одна серия КСЭ с разными сериями ЛАЛ-реактива проявляет активность, равную 5 ЕЭ/нг и 10 ЕЭ/нг, то для получения исходного раствора КСЭ (20 ЕЭ/мл) в первом случае к флакону надо добавить 2,5 мл, во втором 5 мл воды. Очевидно, что реальная активность исходного раствора будет в обоих случаях точно равна 20 ЕЭ/мл. Если использовать округленное значение, то добавлять в обоих случаях можно было бы по 5 мл, но в первом случае раствор был бы намного слабее. При проверке чувствительности в этом случае, скорее всего, на 1 был бы получен отрицательный результат, на 2л - положительный. В принципе это приемлемо. Однако представляется, что лучше оперировать значениями реальной активности КСЭ, тем более, что для этого надо только внимательно прочитать, что написано в Сертификате анализа.

Общая структура и содержание Сертификата Анализа КСЭ

Каждая серия ЛАЛ-реактива и соответствующая ей серия КСЭ сопровождается Сертификатом Анализа. В этом Сертификате указана активность серии КСЭ, установленная по Международному Стандарту Эндотоксина. Сравнение сделано с помощью конкретной серии ЛАЛ-реактива, и активность КСЭ, указанная в Сертификате Анализа, распространяется только на указанные в нем серии КСЭ и ЛАЛ-реактива. Без такого сертификата невозможно использование ЛАЛ-реактива и КСЭ для проведения контрольных анализов.

В Сертификате Анализа указываются следующие данные:

- СОДЕРЖАНИЕ ФЛАКОНА. Общее содержание ЛПС во флаконе в нг, штамм бактерии-продуцента ЛПС, форма выпуска - обычно лиофилизат.
- ОТНОШЕНИЕ RSE/КСЭ. Результаты проверки активности КСЭ по Международному стандарту эндотоксина, проведенной с помощью конкретной серии ЛАЛ-реактива. Такая проверка дает возможность определить активность КСЭ в ЕЭ/нг и рассчитать общее содержание эндотоксина во флаконе.
- ПРАВИЛА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ. Объем воды, необходимый для растворения лиофилизированного КСЭ. Концентрация исходного раствора КСЭ после разведения обычно составляет 20 ЕЭ/мл. Для получения стандартной концентрации, в зависимости от активности КСЭ, к флакону добавляется различный объем воды для ЛАЛ-теста.
- ХРАНЕНИЕ. Условия хранения лиофилизированного препарата и раствора КСЭ.

Примеры Сертификатов анализа для одной серии КСЭ с разными сериями ЛАЛ-реактива.

Контрольный стандарт одной серии может проявлять разную активность с различными сериями ЛАЛ-реактива. В сертификатах указывается активность КСЭ в ЕЭ/нг и общее содержание эндотоксина во флаконе в ЕЭ/фл. Объем воды, используемый для разведения флакона, меняется в соответствии с активностью КСЭ.

В приведенных ниже примерах одна и та же серия КСЭ проявляет разную активность с ЛАЛ-реактивами разных серий. Тот факт, что у реактивов различная чувствительность, имеет частное значение. Аналогичный разброс активности возможен и для реактивов разных серий, но одной и той же чувствительности.

Пример 1.


CHARLES RIVER
LABORATORIES

CERTIFICATE OF ANALYSIS

VIAL CONTENTS: Endosafe® Control Standard Endotoxin is prepared from *E. coli* strain 055:B5. Each vial contains 10 ng of purified Lipopolysaccharide, freeze dried in a stabilized matrix.

RSE/CSE RATIO: The potency of this standard in Endotoxin units, (EU) has been determined to be 10 EU/ng by the method described in Appendix C (***Gel-clot Technique***) of the GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND MEDICAL DEVICES, published by the U.S. Food and Drug Administration.

CSE Lot: EX53392 LAL Reagent Lot: W4202L RSE Lot: EC-6-2

RSE/CSE Ratio: 10 EU/ng Vial contents: 100 EU/vial

Geometric Mean Sensitivity with RSE: 0.03 EU/mL

IS/CSE RATIO: The Expert Committee on Biological Standardization of WHO has assigned a potency of the IS as 10,000 IU per vial of IS, so that 1 IU = 1 EU. The potency of this endotoxin standard in International (Endotoxin) Units, IU, has been designated as 10 IU/ng.

DIRECTIONS FOR USE: Reconstitute the lyophilized material with 5.0 mL of LAL reagent grade water to obtain 20 EU/mL or 20 IU/mL. Vortex mix vigorously for at least 5 minutes after rehydration, and for at least one minute immediately prior to each use.

STORAGE: Store rehydrated material at 2-8°C for up to four weeks. Store lyophilized material at controlled room temperature or refrigerated as preferred. Diluted endotoxin should not be stored except under validated conditions.

CAUTION: DO NOT FREEZE ENDOTOXIN SOLUTIONS

Signature: Cynthia Black Date: 2-13-06
Cynthia Black, Technical Service Coordinator

CA-GC10-00

1023 Wappon Road, Suite 43-B, Charleston, SC 29407 • 843.766.7575 • FAX: 843.766.7576


Контрольный стандарт эндотоксина, серия EX53392, содержание во флаконе 10 нг.

ЛАЛ-реактив, серия W4202L, чувствительность 0,03 ЕЭ/мл.

Активность КСЭ равна 10 ЕЭ/нг, во флаконе содержится 10 нг очищенного ЛПС, следовательно, общее содержание эндотоксина во флаконе, выраженное в единицах эндотоксина составляет 100 ЕЭ.

Флакон разводят 5,0 мл воды для ЛАЛ-теста, концентрация эндотоксина в исходном растворе составляет 20 ЕЭ/мл.

Пример 2.


CHARLES RIVER
LABORATORIES
Endosafe® In Vitro Detection Products

CERTIFICATE OF ANALYSIS

VIAL CONTENTS: Endosafe® Control Standard Endotoxin is prepared from *E. coli* strain 055:B5. Each vial contains 10 ng of purified Lipopolysaccharide, freeze dried in a stabilized matrix.

RSE/CSE RATIO: The potency of this standard in Endotoxin units, (EU) has been determined to be 5 EU/ng by the method described in Appendix C (**Gel-clot Technique**) of the GUIDELINE ON VALIDATION OF THE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE TEST AS AN END PRODUCT ENDOTOXIN TEST FOR HUMAN AND ANIMAL PARENTERAL DRUGS, BIOLOGICAL PRODUCTS, AND MEDICAL DEVICES, published by the U.S. Food and Drug Administration.

CSE Lot: EX53392 LAL Reagent Lot: V2631X RSE Lot: EC-6-2

RSE/CSE Ratio: 5 EU/ng Vial contents: 50 EU/vial

Geometric Mean Sensitivity with RSE: 0.125 EU/mL

IS/CSE RATIO: The Expert Committee on Biological Standardization of WHO has assigned a potency of the IS as 10,000 IU per vial of IS, so that 1 IU = 1 EU. The potency of this endotoxin standard in International (Endotoxin) Units, IU, has been designated as 5 IU/ng.

DIRECTIONS FOR USE: Reconstitute the lyophilized material with 2.5 mL of LAL reagent grade water to obtain 20 EU/mL or 20 IU/mL. Vortex mix vigorously for at least 5 minutes after rehydration, and for at least one minute immediately prior to each use.

STORAGE: Store rehydrated material at 2-8°C for up to four weeks. Store lyophilized material at controlled room temperature or refrigerated as preferred. Diluted endotoxin should not be stored except under validated conditions.

CAUTION: DO NOT FREEZE ENDOTOXIN SOLUTIONS

Signature: Cynthia Black Date: 1-9-06
Cynthia Black, Technical Service Coordinator

CA-GC10-00

1023 Wappoo Road, Suite 43-B, Charleston, SC 29407 • 843.766.7575 • FAX: 843.766.7576 • www.criver.com

Контрольный стандарт эндотоксина, серия EX53392, содержание во флаконе 10 нг.

ЛАЛ-реактив, серия V2631X, чувствительность 0,125 ЕЭ/мл.

Активность КСЭ равна 5 ЕЭ/нг, во флаконе содержится 10 нг очищенного ЛПС, следовательно, общее содержание эндотоксина во флаконе, выраженное в единицах эндотоксина составляет 50 ЕЭ.

Флакон разводят 2,5 мл воды для ЛАЛ-теста, концентрация эндотоксина в исходном растворе составляет 20 ЕЭ/мл.

