ЛАЛ-ЦЕНТР

Аналитические заметки

Тел.: (495) 517-40-37, (495) 380-04-32 E-mail: lalnews@limulustest.ru www.limulustest.ru №6

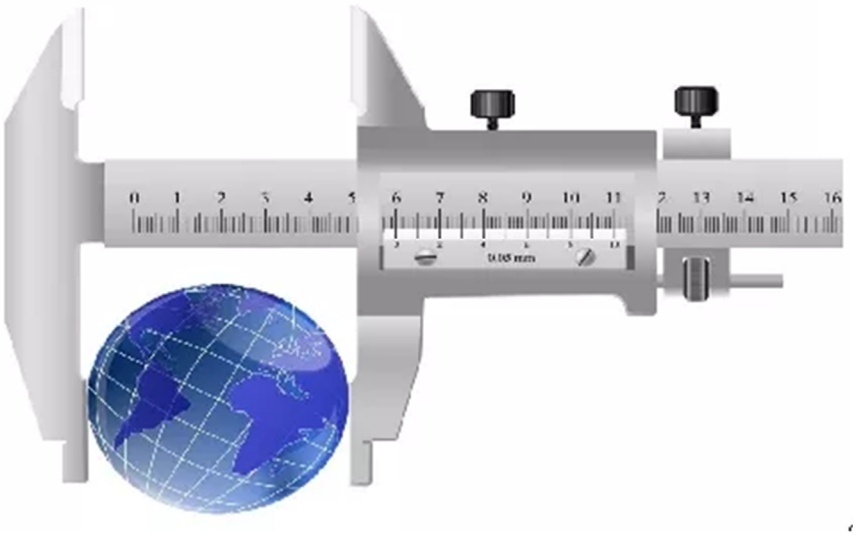
13 февраля 2023

Оценка содержания бактериальных эндотоксинов, проведенная реактивами разных производителей

Демидова В.В. - Руководитель Испытательной лаборатории НПО «ЛАЛ-Центр»

Ожерельева А.С. – Руководитель Организационного отдела Испытательной лаборатории НПО «ЛАЛ-Центр»

В статье приводится сравнение результатов измерений содержания бактериальных эндотоксинов, полученных с помощью реактивов разных производителей. Делается попытка оценки сходимости (воспроизводимости) и правильности (точности) результатов измерений.



Ввиду начала использования реактивов разных производителей нами были проведены несколько серий исследований, в которых проводилось сравнение этих реактивов и проводилось примерное сопоставление результатов проверок одного и того же образца одним методом при использовании разных реактивов. Одной из задач была оценка сходимости (воспроизводимости) и правильности (точности) результатов измерений содержания бактериальных эндотоксинов. Так, оценивая разные реактивы, мы попутно составляли схемы

опытов таким образом, чтобы полученные результаты можно было бы использовать для оценки сходимости результатов, полученных с помощью разных ЛАЛ-реактивов и ТАЛ-реактива.

В настоящей статье обобщаются результаты серий опытов, в задачу которых входила оценка концентрации бактериальных эндотоксинов в нескольких образцах воды для гемодиализа с помощью разных реактивов – лизатов амебоцитов.

Все измерения были сделаны на одном измерительном комплексе, состоящем из ридера для микропланшет Biotek ELx808IU под управлением специализированной программы для проведения фотометрических анализов Endoscan-V. Измерения проводились в одной лаборатории, в ограниченный интервал времени с октября по декабрь 2022 г.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили кинетическим турбидиметрическим методом. В опытах использованы реактивы, предназначенные специально для проведения турбидиметрического кинетического анализа:

- ЛАЛ-реактив Pyrotell-T производства *Associates of Cape Cod, США*
- ЛАЛ-реактив Endosafe KTA2 производства *Charles River Endosafe, США*
- ТАЛ-реактив BioEndo KT производства *Xiamen Bioendo Technology, Китай*

Измерения проводили с помощью калибровочных кривых с одинаковым диапазоном измерения 0,005 – 5,0 ЕЭ/мл.

Исследовали два образца воды для гемодиализа с уже обнаруженным содержанием бактериальных эндотоксинов. Полученные результаты по содержанию эндотоксинов мы попытались обобщить. Интерес представляла сходимость результатов, полученных с помощью одного и того же реактива, и сравнение этих результатов между собой. Также мы попытались оценить правильность определения концентрации по каждому из реактивов.

Отметим сразу, что задача статистической обработки была вторичной, это были скорее попутные результаты, которые благодаря количественным значениям можно использовать для сравнения. Мы прекрасно понимаем, что общее количество опытов и количество опытов по каждому из реактивов крайне недостаточно для целей приемлемой статистической обработки.

1. Сравнение результатов, полученных для двух испытуемых образцов по трем использованным реактивам.

Результаты измерений, полученные с помощью разных реактивов, собраны в сводные таблицы. По каждому реактиву приведены средние значения всех полученных результатов, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение (CV) как степень рассеяния результатов. Результаты приведены по образцам воды для гемодиализа под номерами 1 и 2.

Образцы содержали небольшое количество эндотоксинов. Все образцы во всех анализах проверялись без разведения. Условия проведения анализа были максимально возможно унифицированы.

Таблица №1.

Номер п/п	Результаты для образца 1:			Результаты для образца 2:		
	Endosafe KTA2	**Pyrotell-T**	**BioEndo KT**	**Endosafe KTA2**	**Pyrotell-T**	**BioEndo KT**
1	0,1016	0,2168	0,1399	0,1931	0,5617	0,5389
2	0,0935	0,2872	0,1765	0,2742	0,7131	0,6494
3	0,1087	0,1294		0,2936	0,3669	
4	0,1081	0,3197		0,3787		
5	0,1055			0,5120		
6	0,1310			0,3880		
7				0,2335		
Среднее значение	**0,1081**	**0,2383**	**0,1582**	**0,3247**	**0,5472**	**0,5942**
СКО	0,0125	0,0843	0,0259	0,1089	0,1736	0,0781
CV, %	11,6%	35,4%	16,4%	33,5%	31,7%	13,2%

**СКО - среднеквадратичное отклонение.*

***CV, % - относительное значение среднеквадратичного отклонения в процентах от среднего значения концентрации эндотоксинов.*

Обсуждение результатов

1.1. Разброс результатов по относительным значениям коэффициента вариации оказался довольно значительным для каждого реактива. Незаметно никаких специфических закономерностей, которые можно было бы приписать какому-нибудь реактиву. Разброс результатов в пределах 30-35% еще может считаться статистическим допустимым разбросом результатов.

1.2. Результаты этих экспериментов интересно сравнить с другим циклом исследований, в котором проверялась сходимость для результатов, полученных с помощью одного и того же реактива в предельно унифицированных условиях (*Аналитические заметки /25 января 2023/Вопросы воспроизводимости результатов измерения содержания бактериальных эндотоксинов*). Там разброс результатов для одного и того же образца, полученных с помощью ЛАЛ-реактива одной и той же серии, но в разное время, составил 20,6%. В наших опытах он для

разных реактивов составлял от 11,6% до 35,4%, причем разброс совершенно спорадический, нельзя сказать, что для каких-то реактивов он больше, для каких-то он меньше. Можно только повторить вывод, сделанный в первом нашем исследовании: разброс результатов измерений одного и того же образца для ЛАЛ-теста явление обычное, можно сказать, что это имманентное свойство этого биологического анализа. Это нельзя назвать серьезным недостатком метода, но явление это надо понимать и учитывать при построении схем анализов и при оценке и интерпретации результатов анализов.

2. Оценка общего массива данных измерения содержания эндотоксинов по каждому из образцов.

Все результаты, полученные для каждого образца с помощью всех трех реактивов, использовались для расчета среднего значения содержания эндотоксинов в этом образце. Если принять среднее значение концентрации эндотоксина для каждого из образцов за опорное или истинное содержание эндотоксинов в образце, тогда можно будет оценить правильность оценки содержания эндотоксинов, полученных с помощью каждого из использованных реактивов.

Таблица №2.

Измерение	**Измеренная концентрация эндотоксинов в образце 1, ЕЭ/мл**	**Измеренная концентрация эндотоксинов в образце 2, ЕЭ/мл**
1	0,1016	**0,1931**
2	0,0935	0,2742
3	0,1087	0,2936
4	0,1081	0,3787
5	0,1055	0,5120
6	0,1310	0,3880
7	0,2168	**0,2335**
8	**0,2872**	0,5617
9	0,1294	0,7131
10	**0,3197**	0,3669
11	0,1399	0,5389
12	0,1765	0,6494
Ср.знач.	**0,1598**	**0,4253**
СКО	0,0760	0,1679
СКО %	47,5%	39,5%

2.1. Оценка среднего значения концентрации, полученной для каждого из испытуемых образцов.

Интерес представляют оба массива данных с точки зрения принятия решения о соответствии/несоответствии образца требованиям НД (не более 0,25 ЕЭ/мл). В этом плане оба образца сложные, регистрируемое в них содержание БЭ очень близко к пороговой. Для образца 1 содержание скорее меньше, чем 0,25 ЕЭ/мл. Из 12 результатов только два явно выпадают за норму 0,25 ЕЭ/мл. Зеркальная ситуация и для образца 2, для него все, кроме двух результатов, больше установленной нормы.

Приведенные результаты могут быть еще и хорошей демонстрацией того, почему при проверке часто придерживаются концепции проведения анализа в 1/2МДР или 1/4МДР (иногда используют и большие факторы безопасности). А также, зачем необходимо заранее определить, какими должны быть правила принятия решения о пропуске/выбраковке препарата в условиях контроля качества производственного процесса.

2.2. Отклонения от среднего значения по группам результатов, полученных для разных реактивов.

В таблицах ниже приведено сравнение средних результатов для всех измерений со средними результатами, полученными для разных реактивов. Данные для разных реактивов приведены в ЕЭ/мл и в процентах от измеренного среднего значения. Можно оценить степень правильности (точности) результатов, полученных для разных реактивов.

Таблица №3.

Измеренная концентрация эндотоксинов в образце 1, ЕЭ/мл			
Среднее по всем опытам	**Endosafe KTA2**	**Pyrotell-T**	**BioEndo KT**
0,1598	0,1081	0,2383	0,1582
100%	67,6%	149,1%	99,0%

Измеренная концентрация эндотоксинов в образце 2, ЕЭ/мл			
Среднее по всем опытам	**Endosafe KTA2**	**Pyrotell-T**	**BioEndo KT**
0,4253	0,3247	0,5472	0,5942
100%	59,3%	92,1%	139,7%

В этой номинации тоже нельзя выделить реактив, который давал бы наиболее точное (правильное) измерение содержания эндотоксинов. Никакой закономерности по реактивам не наблюдается. Но, что интересно, правильность измерения для любого из реактивов уложилась в указанный в ОФС.1.2. 4.0006.15. - допустимый диапазон ошибки измерения может составлять 50% - 200% от известной величины. Впрочем, возможно, если бы данных было бы больше, какие-то закономерности были бы лучше видны.

В заключении мы хотим отметить, что эта статья и статья предыдущая, посвященные воспроизводимости результатов, не имеют целью провести оценку пригодности использования каких-либо реактивов (все они давно известны и лицензированы). Мы только хотели поделиться своими наблюдениями и своим отношением к вопросам, которые часто задают пользователи:

- Почему результаты измерения концентрации одного образца такие разные?
- Насколько большим может быть разброс результатов?
- Почему многие НД предлагают проводить проверку на содержание БЭ, меньшее нормативного?

Вопросы разные и поиск ответов для каждого конкретного случая тоже индивидуальный. Но, есть некоторые общие черты у метода, на которые мы и стараемся обратить ваше внимание.