

# ЛАЛ-тест

№1. 2003

*Уважаемые коллеги!*

*Предлагаем Вашему вниманию первый номер бюллетеня. Главная тема этого номера – «Общая Фармакопейная Статья «Бактериальные эндотоксины (ОФС 42-0002-00)» - основной документ, регламентирующий правила проведения ЛАЛ-теста, как средства контроля качества лекарственных препаратов.*

*В разделе «Технические подробности» приведены рекомендации по выбору пластиковых наконечников для автоматических дозаторов и рассматривается вопрос о том, насколько определение «апирогенный» гарантирует их безопасное использование в ЛАЛ-тесте.*

*Цикл статей о компаниях-производителях ЛАЛ-реактива мы, как и обещали, начали с компании Associates of Cape Cod Inc., первой вышедшей на наш рынок.*

*Мы продолжаем начатый в сигнальном номере словарь терминов, связанных с ЛАЛ-тестом. В настоящем номере собраны термины и определения связанные с проведением анализов и оценкой их результатов.*

*Надеемся, что предложенные материалы окажутся для Вас интересными.*

*С уважением, редакционная коллегия бюллетеня «ЛАЛ-тест»*

## **Основные положения общей фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины»**

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

Первой отечественной фармакопейной статьей, регламентирующей правила проведения анализа по показателю «бактериальные эндотоксины», была ВФС 42-2960-97 «Определение содержания бактериальных эндотоксинов. ЛАЛ-тест». Проект этой статьи был подготовлен в начале 90х годов, а введена в действие в статья была в 1997 году.

Главной целью этой статьи было разрешение использования метода, альтернативного анализу пирогенности на кроликах. Статья должна была открыть возможность внедрения нового анализа для предприятий, выпускающих лекарственные препараты, которые сочли бы возможным или необходимым для себя проведение этого анализа вместо контроля пирогенности на кроликах. Статья предлагала широкую свободу выбора метода проведения анализа, способов его валидации и даже, в известной степени, свободу маневра в вопросе определения значения предельно допустимого содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате. Но такая свобода подразумевала необходимость подробного обоснования принятых решений, серьезную исследовательскую работу, которая должна была быть проделана при подготовке частной фармакопейной статьи на препарат. Такой подход имел определенную логику в ситуации начала освоения метода, когда каждая частная статья является «штучным продуктом», а необходимость в стандартизации на более высоком уровне - общей фармакопейной статьи не воспринимается как необходимость ввиду отсутствия массового интереса к анализу.

В конце 90-х годов наметилась тенденция к массовой востребованности этого анализа, как со стороны отечественных производителей лекарственных средств, так и со стороны контрольно-аналитических лабораторий, проверяющих препараты зарубежного и

отечественного производства. В этой ситуации ВФС 42-2960-97 оказалась морально устаревшей. К тому же статья содержала и известные технические недостатки, была не достаточно информативна, многие понятия и определения принятые в ВФС устарели или не прижились. Наконец, немаловажным фактором явились изменения, произошедшие в системе регулирования правил проведения этого анализа за рубежом. В совокупности все эти проблемы и определили необходимость пересмотра общей фармакопейной статьи.

Новая редакция общей статьи была утверждена Фармакопейным комитетом 26 декабря 2000 года. Статья получила название «Бактериальные эндотоксины» и была зарегистрирована под номером ОФС 42-0002-00.

Основными задачами, которые ставились при подготовке проекта статьи были:

1. Правила проведения анализа должны быть в максимально возможной степени стандартизованы.
2. Достоверность результатов должна быть гарантирована на всех этапах анализа.
3. Схема опыта должна быть как можно менее ресурсоемкой и при этом не должна противоречить принципу безопасности результатов.
4. Содержание анализа должно соответствовать международным требованиям. В идеале, анализ, проведенный в соответствии с требованиями ОФС, должен быть эквивалентен анализу, проведенному в соответствии с требованиями USP или Европейской фармакопеи.

Структурно новую статью можно условно разделить на три больших блока.

Первый – назначение анализа, общие определения, правила работы с реактивами, стандартное описание правил проведения эксперимента.

Второй – описание предварительных анализов, которые гарантируют точность и безопасность последующих контрольных анализов. Эти предварительные тесты могут быть встроены непосредственно в контрольный анализ, могут проводиться независимо и должны повторяться по мере необходимости.

Третий блок – описание правил проведения контрольных анализов, по которым можно сделать заключение о соответствии или несоответствии испытуемого препарата требованиям раздела «Бактериальные эндотоксины».

#### **Область применения статьи и основные понятия**

В ОФС вводится понятие основного метода обнаружения бактериальных эндотоксинов, которым является гель-тромб тест. Допускается использование и других методов (турбидиметрического, хромогенного) или модификаций гель-тромб теста. Эти методы или

модификации могут быть использованы в том случае, если будет показано, что их результаты не противоречат основному методу. Качественный гель-тромб тест, в случае необходимости, должен быть использован для проведения арбитражного анализа.

Содержание бактериальных эндотоксинов выражается в Единицах Эндотоксина (ЕЭ). Основным эталонным стандартом является Международный стандарт эндотоксина, который в настоящее время принят всеми основными Фармакопеями: Европейской Фармакопеей, Фармакопеей США, Британской Фармакопеей, Фармакопеей Японии.

Для рутинных анализов разрешено использование Контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), активность которого должна быть определена с помощью Международного стандарта.

В статье кратко сформулированы требования для вспомогательных компонентов реакции. Используемые реактивы и посуда не должны содержать бактериальных эндотоксинов в определяемых в тесте количествах, что примерно соответствует термину «апирогенный». Понятие «апирогенный», по сути своей качественное, в статье не используется, так как ЛАЛ-тест оперирует категориями количественными.

Статья не требует обязательного использования наборов для определения бактериальных эндотоксинов вода, пробирки, буферные растворы и пр. могут быть подобраны произвольно, главное, чтобы они соответствовали указанным в статье требованиям. Основные же реактивы (ЛАЛ-реактив и стандарт эндотоксина) должны быть зарегистрированы в МЗ РФ в обязательном порядке.

В разделе «Процедура анализа» регламентированы общие правила проведения инкубирования и оценки результатов анализа, проводимого основным методом (гель-тромб тест). Эта часть важна еще и потому, что гель-тромб тест является основным и арбитражным. В случае получения спорных результатов, конечное решение принимается по результатам анализа, проведенного с помощью гель-тромб теста. Следовательно, правила его проведения должны быть в максимально возможной степени стандартизованы.

#### **Предварительные анализы**

##### **Валидация метода**

Название - предварительные анализы - условно и не используется в тексте ОФС. Тем не менее, получение достоверных результатов невозможно без проведения анализов, подтверждающих работоспособность ЛАЛ-реактива и его совместимость с испытуемым препаратом. Эти анализы можно назвать предварительными по отношению к контрольным опытам. Валидация метода складывается из двух опытов: «Подтверждения заявленной

чувствительности ЛАЛ-реактива» и анализа «Мешающие факторы».

Целью первого анализа, как следует из его названия, является проверка качества ЛАЛ-реактива. Но назначение его гораздо шире, он служит также и для оценки квалификации вспомогательных материалов и оборудования. Кроме этого он же является и прекрасным средством проверки квалификации персонала, проводящего опыт. Особенной сложности этот опыт не представляет. Результат эксперимента должен соответствовать известному значению чувствительности ЛАЛ-реактива. Чем-то он напоминает упражнение из школьного учебника, когда ответ заранее известен. Этот опыт проводится для каждой новой серии ЛАЛ-реактива и сопровождающей его серии КСЭ. Необходимо помнить, что эта пара должна сопровождаться сертификатом сравнения активности КСЭ/RSE (в сертификате, как правило, указывается именно RSE Reference Standard Endotoxin – стандарт Фармакопеи США, как упоминалось выше, этот стандарт и Международный стандарт эндотоксина, принятый ОФС один и тот же препарат под разными названиями). Опыт должен повторяться в случае новой поставки реактивов даже тех же серий, изменений условий проведения реакции, условий подготовки материалов или при использовании новых вспомогательных материалов (других производителей или поставщиков).

Второй, не менее важный анализ, который должен предшествовать проведению контрольных опытов, - анализ «Мешающие факторы». Назначение этого анализа – подтверждение возможности использования метода для испытуемого лекарственного средства. В опыте должно быть показано, что испытуемый препарат не ингибирует и не усиливает реакции ЛАЛ-реактива с эндотоксином, практически надо продемонстрировать, что свойства эндотоксина в растворе испытуемого препарата такие же, как и в водном растворе. В статье приведена подробная схема проведения опыта, описаны правила проведения необходимых расчетов и указаны условия его повторения.

Как уже отмечалось, оба эти опыта являются базисом валидационных процедур, делающих результаты достоверными. Однако в статье нет прямых указаний и рекомендаций по правилам проведения валидации. Это обстоятельство, в отсутствие документов дополняющих ОФС, делает существующую систему контроля неполной.

#### **Максимально допустимое разведение и Контрольные анализы.**

Основным методом статьи принят способ проведения исследования, называемый Качественным гель-тромб тестом. Анализ может проводиться для препарата, степень разведения которого не превышает значения Максимально допустимого разведения (МДР). Разведение

препарата обычная практика, часто оно необходимо для преодоления ингибирования, к тому же чувствительность ЛАЛ-реактива в большинстве случаев оказывается намного выше предельно допустимого содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемых препаратах. Ряд разведений ограничивается значением, за которым полученные результаты уже не будут иметь смысла. Величина максимально допустимого разведения зависит от предельно допустимого содержания бактериальных эндотоксинов в препарате и от чувствительности ЛАЛ-реактива.

Целесообразно проводить анализ в разведении меньшем МДР. В литературе часто встречается вполне разумная рекомендация проводить анализ в разведении, равном  $\frac{1}{2}$  МДР. В этом случае отрицательные результаты однозначны даже с учетом возможной двукратной ошибки опыта. Единственная ситуация, в которой анализ можно проводить только в МДР это повторный анализ.

Схема проведения качественного теста, пожалуй, наиболее проста и не требует специальных комментариев. Можно только отметить, что анализ должен быть проведен индивидуально для каждого испытуемого образца (из выборки, сделанной в зависимости от количества единиц в серии). Если опыты проводятся одновременно и одним устройстве для инкубирования, то два из трех контролей - отрицательный и положительный - могут ставиться для всех испытуемых проб.

Проведенный в расширенном виде гель-тромб тест позволяет определить реальную концентрацию бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате. Такой анализ называется Количественным гель-тромб тестом. Надо обратить внимание на несколько обстоятельств, связанных с постановкой количественного теста. Первое – его можно проводить в том случае, если метод был валидирован для разведения значительно меньшего, чем МДР (как минимум в 4 раза меньшего). Второе – в опыт предлагается включать положительный контроль испытуемого препарата только в одном наименьшем разведении. Это логично, так как если в этом разведении ингибирование отсутствует, его не будет и в следующих разведениях. Но это условие верно только для валидированных анализов. В предварительном анализе «Мешающие факторы» должно быть показано, что в этом разведении нет ни ингибирования, ни усиления реакции. Третье – согласно схеме проведения опыта в качестве положительного контроля, ставится стандартная серия разведений КСЭ, а не положительный контроль с концентрацией эндотоксина равной 2л, как в качественном анализе. Это общее правило, но у него могут быть исключения. Такая серия стандартных разведений КСЭ может ставиться один раз в начале работы (имеется ввиду рабочий день) и в том случае, если опыт предыдущей работы показывает, что в лаборатории получают всегда

однозначные результаты при анализе серии разведений КСЭ. В последующих опытах в этом случае может ставиться только положительный контроль – КСЭ в концентрации 2λ. Надо помнить, что проведение только качественных анализов не освобождает от ежедневной постановки серии разведений КСЭ, несмотря на то, что схемой собственно качественного анализа это не предусмотрено.

#### **К вопросу о гармонизации отечественных и международных требований.**

За последние несколько лет в системе регулирования правил проведения ЛАЛ-теста произошли серьезные изменения. Главное событие – это принятие ведущими фармакопеями (Фармакопеей США и Европейской Фармакопеей) новой согласованной редакции статьи «Бактериальные эндотоксины». Правила проведения анализа стали практически одинаковы. Это движение фармакопей навстречу друг другу называют гармонизацией, а новую статью гармонизированной статьей.

Если рассматривать новую редакцию отечественной статьи «Бактериальные эндотоксины» в сравнении с измененными статьями Фармакопеи США и Европейской фармакопеи, можно отметить, что в части, касающейся правил проведения геле-тестов, различий практически нет. В то же время в отечественную статью не включены фотометрические методы (хромогенный и турбидиметрический). Причина в том, что эти методы пока почти не востребованы и опыта практического их применения нет. Отечественная статья не запрещает их использование, но приводит подробное описание их сейчас было бы нецелесообразно.

Наиболее значительное отличие отечественной статьи – разрешение использовать контрольный стандарт эндотоксина наряду с Международным стандартом. В новой редакции Европейской и Американской фармакопей разрешается использовать только Международный стандарт эндотоксина. Однако это не может рассматриваться как недостаток. Сохранение возможности проведения анализа с использованием стандарта вторичного по отношению к Международному имеет практический смысл, так как КСЭ значительно дешевле. В действительности все двадцать лет использования ЛАЛ-теста все контрольные анализы проводились именно с помощью КСЭ, Международный стандарт использовался только для аттестации ЛАЛ-реактива и контрольных стандартов на стадии их промышленного получения. Таким образом, временная консервация правил, разрешающих использование КСЭ, не представляет особой опасности.

Что касается исключения КСЭ из текстов Европейской и Американской Фармакопей, то это обстоятельство вызвало серьезное замешательство,

как среди производителей ЛАЛ-реактива, так и среди пользователей. Последовало разъяснение, из которого следует, что хотя КСЭ и не упоминается в тексте статьи, но использовать его можно, как и прежде.

В целом можно считать, что набор требований по проведению анализа методом геле-тестов, приведенный в ОФС, практически идентичен требованиям к проведению этого теста, приведенным в зарубежных Фармакопеях.

#### **Заключение.**

Хотя новая статья и стала намного подробнее ВФС 42-2960-97, информации, содержащейся в ней, может оказаться недостаточно, особенно для человека неподготовленного. Эта проблема может быть довольно легко решена путем издания практического руководства, комментариев к ОФС, с помощью цикла статей, разъясняющих наиболее сложные вопросы.

Более сложный вопрос – определение условий или правил включения раздела «Бактериальные эндотоксины» в ФСП. Пока нет четко сформулированных требований относительно того, перевод каких препаратов на ЛАЛ-тест может считаться предпочтительным. Какие препараты могут проверяться и ЛАЛ-тестом и на кроликах. И, наконец, какие препараты нельзя проверять на кроликах, а можно проверять только ЛАЛ-тестом.

Еще один недостаток отечественной системы регулирования правил введения ЛАЛ-теста связан с отсутствием утвержденных правил расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате. В ОФС используется понятие «Предельное содержание бактериальных эндотоксинов» в испытуемом препарате и оговаривается ряд условий, соблюдение которых гарантирует однозначность трактовки результатов опыта и безопасность препарата, прошедшего анализ. Но, правила расчета и отправные значения пороговой пирогенной дозы в зависимости от способа введения лекарственного средства не включены в статью.

Перечисленные проблемы могут быть освещены в методических указаниях или инструкциях по правилам введения анализа «Бактериальные эндотоксины» в ФС или ФСП.

Наконец, еще один вопрос, требующий специального освещения – валидация анализа. В свою очередь валидацию эту можно разделить на валидацию реактивов и материалов, валидацию метода для лекарственного препарата и валидацию оборудования, используемого при подготовке и проведении анализа.

Опыты, определяющие валидацию метода и материалов, включены в ОФС. Вместе с тем сама процедура валидации, взаимоувязка разных опытов, условия их повторения не являются объектом регулирования ОФС. Можно сказать, что фармакопейная статья предлагает средства



решения вопросов валидации, но не предлагает методики ее проведения. Так, например, для валидации метода проводится анализ «Мешающие факторы». Процедура этого анализа подробно описана в ОФС. Однако в статье не указано сколько серий испытуемого препарата надо проверять и в каких случаях проводить ревалидацию. Примерно такая же ситуация с валидацией рутинных анализов. Как уже отмечалось выше, возможны разные варианты постановки положительного контроля, положительного контроля испытуемого препарата, постановки стандартной серии разведений стандарта эндотоксина для ежедневной проверки работоспособности ЛАЛ-реактива.

Вопросы валидации оборудования, используемого при подготовке и проведении ЛАЛ-теста, вообще никак и нигде не освещаются. Вместе с тем, представление о правильно проведенном анализе предполагает валидацию сухожарового шкафа и процедуры депирогенизации, устройства для проведения инкубирования (термоблока или водяной бани), дозирующих устройств (автоматические дозаторы) и пр. Косвенно о нормальной работе оборудования можно судить по результатам анализа «Подтверждение заявленной чувствительности», но такая косвенная оценка не освобождает от необходимости детальной проверки, например, режима работы сухожарового шкафа и эффективности процесса депирогенизации.

Эти вопросы можно решить либо в рамках методических указаний по введению ЛАЛ-теста, либо с помощью отдельного документа, регламентирующего правила валидации метода, материалов и оборудования.

Совершенно очевидно, что необходимо и более подробное описание правил проведения анализа. Эти правила могут быть изложены в методических указаниях или в рекомендациях по проведению анализа. Такую роль играют, например, «Указания по валидации» FDA, изданные в 1987 и переизданные в 1994 г. В Европейской фармакопее множество подробностей содержится в «Указаниях по валидации», которые являются «необязательной» частью статьи «Бактериальные эндотоксины». Эти документы по объему во много раз превосходят фармакопейные статьи и содержат множество примеров.

Впрочем, рассчитывать, что методические указания по правилам введения ЛАЛ-теста в ФСП и по валидации анализа разом решат все вопросы, было бы наивно. Формат такого документа не позволяет превратить его в учебник. Да и учебник, даже очень хороший, быстро устареет. Не менее важно формирование информационного пространства, которое объединило бы всех работающих с методом. Издание научной литературы, обмен опытом, формирование приемлемых для всех правил может быть потенциально более ценным, чем набор нормативных документов. Не секрет, что в Европе

многие правила формируются независимыми ассоциациями специалистов и не являются обязательными, но производство считается хорошим только в том случае, если оно соответствует этим нормам и правилам. Формирование такой среды, которая может осуществлять эффективное саморегулирование, очень сложная задача, но и значимость ее может быть очень высока.

#### Литература.

1. ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины»,
2. ВФС 42-2960-97 «Определение содержания бактериальных эндотоксинов. ЛАЛ-тест».
3. *Bacterial endotoxins*, 2.6.14., *European Pharmacopoeia, III Ed., Strasbourg France. Supp. 2001.*
4. *British Pharmacopoeia, London 2001.*
5. *The United States Pharmacopoeia, 24-th Ed. Suppl. 2. 2000.*
6. "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.*

## Пластиковые наконечники для автоматических пипеток.

*Г.В.Долгова*

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 «апирогенные» это то, что нужно для работы. Если со стерильностью все однозначно и понятно, то «апирогенность» может ввести в заблуждение. Дело в том, что производители, маркирующие свою продукцию, таким образом, проверяют ее методами, принятыми для проверки апирогенности 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 «апирогенный» 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 «апирогенный» 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°C. 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 попытаться 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, апирогенны. 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 Assemblies and similar medical devices» //<161> The United States Pharmacopoeia, 24-th Ed., 1999.
3. "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.
4. Berzofsky R.N. "Screening LAL accessories"//LAL Review. Published by BioWhittaker. Inc. Summer 2000

## Компании - производители ЛАЛ-реактива. Associates of Cape Cod Inc.

*А.Г.Ситников, Н.П.Неугодова*

Компания Associates of Cape Cod Inc. (АСС) была основана в 1974 году. Идея организации компании, которая производила бы ЛАЛ-реактив в коммерческих целях, принадлежала Стэнли Уотсону (Stanley Watson). Сам он занялся ЛАЛ-тестом случайно, при проведении исследований в Океанографическом Институте Вудхолла (WHOI) Объектом его исследований были компоненты мембран грамотрицательных бактерий. Степень очистки полученных препаратов можно было оценить по отсутствию фрагментов внешних стенок грамотрицательных бактерий, т.е. по отсутствию бактериальных эндотоксинов. ЛАЛ-тест уже тогда был признан лучшим способом регистрации эндотоксинов. Однако, в начале 70-х годов реактив в промышленных масштабах не выпускался. Уотсон решил сделать препарат для исследовательских задач самостоятельно. Потом он говорил, что собирался посвятить этой «второстепенной задаче» несколько недель. В процессе работы пришлось решать вопросы стабильности препарата и поиска средств увеличения его чувствительности. Промежуточным этапом работы явились несколько научных статей и патент на производство ЛАЛ-реактива. В процессе работы Уотсон пришел к выводу о необходимости и своевременности выпуска ЛАЛ-реактива как коммерческого препарата. Похоже, что в 1974 году эта идея несколько обогнала свое время. Не найдя поддержки в институте, в котором он работал, Уотсон решил осуществить свою идею самостоятельно и основал компанию АСС. По началу штат компании составлял несколько человек, а располагалась она в старом гараже. Но настойчивость и уверенность в правильности выбранного пути сделали свое дело. Качество, стабильность и чувствительность выпускаемого препарата неуклонно повышались. В 1977 FDA признало качество выпускаемого АСС препарата, выдав лицензию на производство ЛАЛ-реактива. Это была первая лицензия, выданная на производство ЛАЛ. К тому времени компания располагала уже солидными производственными площадями и была хорошо известна среди исследователей, использующих ЛАЛ-тест в своей работе.

Конец 70-х, начало 80-х годов были временем роста популярности метода, который, в свою очередь, стимулировал и производство реактивов. В середине 80-х годов удовлетворением спроса занимались не менее 8 компаний только в США. Показательно, что пережили бум популярности менее половины из них. Среди компаний, сохранивших свое право производить ЛАЛ-реактив до сих пор, и получившая первую лицензию АСС. Наверное, важная закономерность заключалась в том, что компании, сохранившие

свои позиции, занимались не только производством, а вели и ведут серьезную исследовательскую работу. Они соревнуются между собой, предлагая новые реактивы, вводя новые стандарты и правила проведения анализа, предлагая аппаратное обеспечение, автоматизируя анализ. Каждая из существующих ныне компаний заслужено гордится своими достижениями в области развития метода. Не составляет исключения и АСС. На ее счету множество инноваций, сделавших ЛАЛ тест таким, каким мы его знаем сегодня. К приоритетным разработкам компании относятся:

- Первый коммерческий ЛАЛ-реактив.
- Первый ЛАЛ-реактив для проведения кинетического турбидиметрического теста и гел-тробм теста.
- Первая автоматизированная система для проведения кинетического турбидиметрического анализа.
- Первый ЛАЛ-реактив, предназначенный для проведения турбидиметрического теста.
- Первый стандарт эндотоксина, приготовленный в виде раствора (NP-2)
- Несколько модификаций кинетического хромогенного теста.

Кроме этого компания первой стала производить привычные теперь компоненты наборов, такие как специальная вода для ЛАЛ-теста, буферные растворы и многое другое.

Этапным для компании стало слияние с японской фирмой Seikagaku Corporation, которая известна своими разработками в области кинетического хромогенного теста.

Хочется отметить большую работу, связанную с популяризацией метода. Компания АСС проводит тематические семинары и издает информационный бюллетень, который не только знакомит с продукцией компании, но и является гидом, помогающим его читателям быть в курсе всех новостей.

В Россию эта компания тоже пришла первой. Пожалуй, и в этом можно отметить политику компании – участие в формировании среды, а не простое ее использование.

### Литература.

1. Sullivan J., Watson S.W. Factors affecting the sensitivity of *Limulus lysate*. // *Appl Microbiol* 1974 V.28.,P.1023-1026.
2. Novitsky T.J. Choosing a method. // *LAL Update*, 1983, Vol.1.,No.1
3. The history of LAL and Associates of Cape Cod, Inc. // *LAL Update* 1994, Vol 12.,No. 1
4. Novitsky T.J. Discovery to commercialization: The blood of the horseshoe crab. // *Oceanus*. 1984, Vol. 27., No. 1., P. 13-18.
5. *LAL Update* 1983, Vol 1., No. 1. - *LAL Update* 2002, Vol 20, No.3

## Термины и определения

### Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива ( $\lambda$ ) (Labeled LAL Reagent Sensitivity, Sensitivity of lysate)

Чувствительность ЛАЛ реактива ( $\lambda$ ), 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 (Maximum Valid Dilution)

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 (LAL Reagent Water, LRW, Water LAL)

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 (Firm gel)

Гель, который образуется в результате реакции ЛАЛ-реактива и БЭ, фиксируется на дне пробирки и не разрушается при аккуратном однократном ее переворачивании на 180°

### Положительная реакция, положительный результат (Positive result, positive reaction)

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 (Negative result, negative reaction)

Отсутствие плотного геля в реакционной смеси или образование геля, который разрушается при переворачивании пробирки на 180°. Также является характеристикой одного определения.

### Отрицательный контроль (Negative control)

Представляет собой реакционную смесь – ЛАЛ-реактив + Вода для ЛАЛ-теста. Ставится для каждого инкубирования. Может быть один для нескольких анализов, проводимых одновременно в одних и тех же условиях. Подтверждает соблюдение мер асептики при подготовке и проведении анализа. Обычно ставится в двух повторностях. Результаты должны быть отрицательными.

### Положительный контроль (Positive control)

Представляет собой реакционную смесь ЛАЛ-реактив + раствор контрольного стандарта эндотоксина в концентрации, гарантирующей образование плотного геля (2 $\lambda$ ). Ставится в двух повторностях. Проводится для каждого анализа (инкубирования). Подтверждает работоспособность ЛАЛ-реактива в условиях анализа. Результаты должны быть положительными. При проведении количественного геля-тромб теста, положительный контроль представляет собой стандартную серию разведений КСЭ в концентрациях 2 $\lambda$ ,  $\lambda$ , 0,5 $\lambda$  и 0,25 $\lambda$ . Служит для подтверждения заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива в условиях опыта.

### Положительный контроль испытуемого образца (Positive product control)

Представляет собой испытуемый препарат в выбранном для анализа разведении, к которому добавлен раствор эндотоксина в концентрации, гарантирующей образование твердого геля (2 $\lambda$ ). Необходим для демонстрации того, что в условиях анализа препарат не ингибирует реакцию ЛАЛ-реактива и эндотоксина. Ставится в двукратной повторности.

**Тема следующего номера – «ЛАЛ - тест и испытание на пирогенность в опытах на кроликах – сравнение методов». Вопрос этот настолько интересен и важен, что по всей вероятности ему будет посвящен весь номер целиком. Номер будет включать несколько статей по истории перехода на ЛАЛ - тест в США и в Европе, современному представлению о месте каждого из методов. И, наконец, о сложившейся у нас практике взаимозаменяемости методов.**

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

Редакционная коллегия бюллетеня «ЛАЛ-тест»:

Ситников А. Г.

Неугодова Н.П.

Долгова Г.В.

Йорданова-Пашевич А.

Главный редактор: Ситников А.Г.

Ответственный за выпуск: к.б.н. Йорданова-Пашевич А.

Подписано к печати: 23.12.2002 г.

Формат А4; Бумага: 100 г/м<sup>2</sup>; Печать: Ризограф; Объем: 8 стр.; Тираж: 250 экземпляров.

Издатель ООО «Центр по биотехнологии, медицине и фармации» Россия, Москва, 113105, ул. Нагатинская, 3а. Тел/факс 111-51-55

Лицензия на издательскую деятельность: Код 221 Серия ИД № 00274

Типография : ООО «Копиринг», Москва.