

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДИКАТОРОВ ЭНДОТОКСИНА ДЛЯ ВАЛИДАЦИИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕПИРОГЕНИЗАЦИИ



ОГЛАВЛЕНИЕ

- Введение**
- 1 Депирогенизация**
- 2 Индикаторы эндотоксина 2000 ЕЭ/флакон**
- 3 Использование индикаторов эндотоксина для проверки эффективности депирогенизации**
- 4 Оценка эффективности процедуры депирогенизации кинетическим методом**
- 5 Оценка процедуры депирогенизации гель-тромб тестом**
- 6 Заключение**

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для многих фармацевтических производств все более актуальными становятся вопросы по проведению валидации процессов термической депирогенизации. Аттестация и валидация оборудования, используемого для депирогенизации на предприятии, – это многоплановый процесс, который зависит от задач конкретного производства. Заключительная стадия этого процесса – оценка эффективности проведенной депирогенизации. Для этого проводят один или несколько модельных экспериментов, в которых проверяют степень снижения активности эндотоксинов после депирогенизации. Обычно на этой стадии используют специальные препараты - индикаторы эндотоксина во флаконах на 10 мл. Они не требуют специальной предварительной подготовки, флаконы с лиофилизированным эндотоксином помещают непосредственно в валидируемое оборудование.

В данной работе мы рассматриваем различные варианты проведения оценки эффективности депирогенизации, и приводим примеры реально проведенных опытов. Мы описываем результаты практических опытов, проведенных в нашей лаборатории различными методами: кинетическим хромогенным методом и методом гель-тромб тест, в которых были использованы индикаторы эндотоксина с активностью 2000 ЕЭ во флаконе.

В инструкции на индикаторы эндотоксина производитель указывает, что лучше всего для оценки снижения активности эндотоксина подходят кинетические анализы. Конечно, в этом есть своя логика, но все же фотометрические методы у нас в стране пока не очень широко распространены. Мы хотели показать, что проверка не менее успешно может быть проведена и с помощью привычного гель-тромб теста.

В настоящих рекомендациях мы рассматриваем исключительно вопрос вариантов проверки эффективности процедуры депирогенизации и правил использования, предназначенных для индикаторов эндотоксина для прямой валидации. Правила проведения валидации оборудования в деталях мы не рассматриваем, так как на каждом предприятии будут свои конкретные требования к проведению валидации процесса депирогенизации. В нашей работе процедура депирогенизации была только смоделирована, мы обрабатывали флаконы с индикаторами эндотоксина в сухожаровом шкафу без полной загрузки, без оценки распределения температуры в

камере, без учета зональности нагрева, наконец, цикл депирогенизации был единичным.

Мы надеемся, что приведенные примеры с подробным описанием подготовки препаратов эндотоксина к проведению опытов двумя методами, а также описанные иные варианты проведения таких испытаний помогут нашим читателям разработать собственную концепцию использования индикаторов эндотоксина и выбрать такой вариант проверки эффективности процедуры термической депирогенизации, который в наибольшей степени будет отвечать специфике производства и возможностям контрольной лаборатории.

1. ДЕПИРОГЕНИЗАЦИЯ

Депирогенизацией называют процедуру устранения или разрушения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Обычно способы депирогенизации делят на две большие группы. Первая группа – удаление эндотоксинов с поверхности изделий (многократное ополаскивание водой для инъекций) или из растворов (ультрафильтрация, использование фильтров на основе активированного угля, асбеста, обратный осмос, дистилляция и применение эндотоксин-связывающего белка). Вторая группа - разрушение или инактивация эндотоксинов (термическая депирогенизация, ионизирующая радиация, обработка кислотой или щелочью).

Наиболее надежным способом депирогенизации является термическая депирогенизация - процесс воздействия высоких температур в течение заданного времени. Этот режим упомянут во всех фармакопеях. В ОФС «Бактериальные эндотоксины» в разделе «Посуда и ее подготовка» указан режим термической депирогенизации: нагревание при температуре 250°C не менее 30 минут. Такая обработка применима для стеклянной посуды и других материалов, выдерживающих температурную обработку. Проводят термическую депирогенизацию в сухожаровых шкафах и в стерилизационных туннелях, в которых проводится обработка мытых флаконов или ампул перед розливом.

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. В процессе изучения динамики термической депирогенизации было показано, что при температуре 190°C разрушение эндотоксинов происходит за 65,4 минут, и достаточно всего 1,5 минуты для разрушения эндотоксинов при температуре 250°C. При такой температуре происходит полное разрушение эндотоксинов.

По современным представлениям депирогенизация считается эффективной в том случае, если она приводит к снижению концентрации эндотоксинов как минимум в 1000 раз (3 log).

Для оценки эффективности процесса депирогенизации проводят определение содержания эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста до и после процесса, при этом необходимо показать, что содержание эндотоксинов снизилось более чем в 1000 раз.

2. ИНДИКАТОРЫ ЭНДОТОКСИНА 2000 ЕЭ/ФЛАКОН

Для оценки эффективности способа удаления/разрушения эндотоксинов используются специальные препараты эндотоксина – индикаторы эндотоксина. Эффективность процесса депирогенизации может быть оценена путем сравнения результатов измерений содержания эндотоксинов с использованием ЛАЛ-реактива до и после цикла депирогенизации.

Индикаторы эндотоксина - это флаконы с лиофилизированным липополисахаридом E.coli 055:B5. Препараты эндотоксина не содержат наполнителей и стабилизаторов, поэтому флаконы кажутся пустыми. Флаконы с препаратами эндотоксина хранят при 2 - 25°C.

При термической депирогенизации используют индикаторы эндотоксина для прямой валидации. При прямом методе флаконы с препаратом эндотоксина не требуют специальной подготовки, их помещают непосредственно в валидируемое оборудование. Индикаторы эндотоксина могут иметь разное содержание эндотоксина во флаконе: 2000 ЕЭ/флакон, 10 000 ЕЭ/флакон или 100 000 ЕЭ/флакон. Они поставляются в наборах по 12 или по 100 флаконов. Такие фасовки объясняются тем, что для валидации цикла депирогенизации может понадобиться от нескольких штук до десятков флаконов. Процедура валидации оборудования может включать несколько циклов обработки для получения статистически достоверных результатов. Из всего этого спектра препаратов эндотоксина для оценки эффективности процедуры термической депирогенизации лучше всего подходят флаконы с содержанием эндотоксина, равным 2000 ЕЭ/флакон. Препараты с содержанием эндотоксина, соответствующим 100 000 ЕЭ/флакон, занимают промежуточное положение между индикаторами для прямой валидации и индикаторами для непрямой валидации. Последние могут содержать от 1 000 000 ЕЭ/флакон до 10 000 000 ЕЭ/флакон. Такие препараты используются, как правило, для подготовки очень концентрированных растворов эндотоксина, которые потом используют для моделирования загрязнения эндотоксинами оборудования или материалов. Также концентрированные растворы могут быть использованы для искусственного загрязнения растворов готовых лекарственных средств при отработке методики пробоподготовки испытуемого препарата или устранения мешающих факторов. Это делается на стадии валидации ЛАЛ-теста для лекарственного препарата.



В Сертификате активности, который выдает компания-производитель, указываются номер серии, сроки годности, штамм бактерии, из которой получен эндотоксин, масса эндотоксина во флаконе и его примерная активность.

charles river

Endosafe®
Endotoxin Indicators (EUV2K)
Certificate of Quality

Each vial of Endotoxin Indicator Lot #: EVV73111 Expiration Date: Nov 2019
contains approximately 200 ng of lipopolysaccharide (derived from *E.coli* Strain 055:B5).

The biological activity is approximately 2,000 Endotoxin Units (EU) of lipopolysaccharide, as determined by serial two-fold dilution at the endpoint with Gel Clot U.S. Reference Lysate Lot # 15.

The absence of assay interfering substances was demonstrated by acceptable spike recovery in the range of 50% to 200%.

Qualified Analyst Donna Sijts Date 29 Nov 2017

Reviewed By KJenna Date 30 Nov 2017

Биологическая активность индикаторов эндотоксина определяется производителем с помощью ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста. Но сертификат

активности эндотоксина с ссылкой на конкретную серию ЛАЛ-реактива не выпускается. Поскольку индикаторы эндотоксина поставляются без ЛАЛ-реактива, в сопроводительных документах отсутствует привычный сертификат анализа производителя для конкретных серий ЛАЛ-реактив/КСЭ. Без ссылки на конкретную серию ЛАЛ-реактива производитель не имеет права указывать активность эндотоксина. Поэтому в сертификате указывается, что активность примерно равна 2000 ЕЭ. На практике же это «примерно» практически всегда точно 2000 ЕЭ.

Такой подход дает возможность пользователю выбрать наиболее подходящий для него метод проведения анализа и ЛАЛ-реактив. С помощью привычного инструментария можно подтвердить или самостоятельно установить активность индикаторов эндотоксина в рамках допустимой ошибки опыта с используемой серией ЛАЛ-реактива.

После определения содержания эндотоксинов в необработанных и обработанных флаконах рассчитывают степень снижения содержания эндотоксинов после депирогенизации.

Степень снижения концентрации эндотоксинов = \log (концентрация эндотоксинов в необработанном флаконе, ЕЭ/мл) - \log (концентрация эндотоксинов в обработанном флаконе, ЕЭ/мл) > 3.

Полученное значение должно быть больше 3 \log , что соответствует снижению концентрации более чем в 1000 раз.

Производитель рекомендует проводить проверку кинетическими методами. Это логично, кинетические анализы дадут, как минимум, цифру исходной концентрации эндотоксина в необработанных флаконах и, возможно, зарегистрируют остаточное содержание эндотоксинов в обработанных флаконах. Вместе с тем, анализ может быть проведен и гель-тромб тестом, и результаты будут вполне удовлетворительными.

Ниже мы рассматриваем различные варианты оценки эффективности процедуры термической депирогенизации разными методами и в разной модификации.

3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДИКАТОРОВ ЭНДОТОКСИНА ДЛЯ ПРОВЕРКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕПИРОГЕНИЗАЦИИ

Смысл проверки процедуры депирогенизации сводится к следующему: часть флаконов индикаторов эндотоксина не подвергают обработке и оставляют в качестве контроля (необработанные флаконы), часть флаконов подвергают депирогенизации (обработанные флаконы). Количество флаконов для контроля и для депирогенизации определяет пользователь в зависимости от типа оборудования, стандартного объема загрузки и т.д. После проведения депирогенизации определяют содержание эндотоксинов в обработанных и необработанных флаконах.

В необработанных флаконах концентрация полученного раствора эндотоксина должна составить 2000 ЕЭ/мл, в обработанных флаконах концентрация должна быть, как правило, ниже порога определения метода. Эффективность депирогенизации оценивают путем сравнения количества эндотоксинов в обработанных флаконах с количеством эндотоксина в необработанных флаконах. Если степень снижения активности эндотоксина после депирогенизации составляет более 3 log, процесс депирогенизации можно считать валидированным.

ЛАЛ-тест следует проводить с помощью реактивов, сопровождаемых сертификатом анализа производителя, и выдержавших предварительные испытания при входном контроле. Для реактивов для гель-тромб теста должен быть проведен анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», для реактивов для кинетических анализов должны быть выполнены требования раздела ОФС «Подтверждение критериев достоверности калибровочной кривой». Анализ может быть проведен одним из описанных в ОФС «Бактериальные эндотоксины» методов. Для растворов, полученных в необработанных и в обработанных флаконах, необходимо ставить положительный контроль испытуемого образца для подтверждения отсутствия мешающих факторов.

В целом процедура оценки эффективности депирогенизации состоит из нескольких этапов:

- Подготовка флаконов к депирогенизации;
- Проведение депирогенизации;
- Подготовка растворов эндотоксина в необработанных (контрольных) и обработанных флаконах;

- Проведение определения концентрации эндотоксинов в растворах из необработанных (в выбранном разведении) и обработанных флаконов;
- Проведении расчетов степени снижения активности эндотоксинов после депирогенизации.

Ниже описываются процедуры подготовки флаконов к проведению депирогенизации, приводятся условия проведения депирогенизации и последующая подготовка флаконов к проверке с помощью ЛАЛ-теста. В опытах, которые подробно разбираются в настоящем руководстве, мы использовали всего несколько флаконов индикаторов эндотоксина, поскольку задачей экспериментов была отработка возможных вариантов проверки содержания эндотоксинов до и после депирогенизации. Задачи проведения валидации оборудования в данном случае не ставилось. Вне зависимости от того, сколько флаконов будет подвергнуто депирогенизации, сколько будет оставлено в качестве контроля и сколько циклов депирогенизации будет проведено, алгоритм действий на первых этапах работы будет одинаковым.

Подготовка флаконов к обработке, депирогенизация. Подготовка растворов эндотоксинов.

В качестве индикаторов использовали препараты индикаторов эндотоксина 2000 ЕЭ/флакон производства Charles River Endosafe, США.

С флаконов, которые будут подвергнуты депирогенизации, удаляли алюминиевые колпачки и резиновые пробки, затем флаконы закрывали алюминиевой фольгой, этикетки с флаконов не удаляли. Подготовленные флаконы помещали в сушильной шкаф.



Проведение депирогенизации.

Процесс депирогенизации проводили в сушильном шкафу Memmert UN110pus с естественной конвекцией и с диапазоном рабочих температур от +30 до +300°C, производства Memmert GmbH, Германия.

Режим депирогенизации составлял 250°C в течение 30 минут. Общее время работы шкафа составило 120 минут, из них: 50 минут - выход на рабочий режим 250°C и 30 минут - собственно депирогенизация.

Подготовка растворов эндотоксина в необработанных (контрольных) и обработанных флаконах.

По окончании цикла депирогенизации в обработанные и в необработанные (контрольные) флаконы добавляли согласно инструкции по 1,0 мл воды для ЛАЛ-теста. Полученные растворы перемешивали на вихревой мешалке в режиме: сначала 2 минуты, затем по одной минуте через каждые 10 минут в течение получаса. Анализы проводили сразу после перемешивания подготовленных растворов.

Содержание эндотоксинов в необработанных и обработанных флаконах проводили методами D и A. В настоящей работе в п. 4.1 и 5.1 приводится подробное описание проведения ЛАЛ-теста этими методами, разбираются реально полученные результаты и приводятся расчеты определенной для каждого опыта степени снижения активности эндотоксинов для необработанных и обработанных флаконов индикаторов эндотоксина.

4. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕДУРЫ ДЕПИРОГЕНИЗАЦИИ КИНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.

Производитель рекомендует использовать кинетические анализы для оценки эффективности депирогенизации, указывая при этом, что проверку можно проводить в стандартном диапазоне концентраций КСЭ 0,05 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл и 5,0 ЕЭ/мл.

В п. 4.1. приводится подробное описание анализа, проведенного с помощью кинетического хромогенного теста (Метод D). Нам было интересно проверить обработанные флаконы с максимально широким диапазоном и с максимально возможной чувствительностью для кинетических анализов, соответствующей значению 0,005 ЕЭ/мл.

В п. 4.2. рассматриваются другие варианты проверки, проводимой с помощью кинетических анализов.

4.1. Описание подготовки и проведения опыта, проведенного с помощью кинетического хромогенного метода

Реактивы и материалы

В работе использовали ЛАЛ-реактив Endochrome-K для кинетического хромогенного метода (Метод D), контрольный стандарт эндотоксина, КСЭ E.coli 055:B5 производства Charles River Endosafe, США, воду для ЛАЛ-теста и пробирки для разведений 13x100 мм «Пиротест» производства ООО «НПО «ЛАЛ-Центр». Также в испытаниях использовали дозаторы электронные и механические, вихревые мешалки.



Измерение проводили на фотометре микропланшетном ELx808IU производства Bio-Tek instruments, США, для управления фотометром во время анализа, сбора и обработки результатов использовали ПО Endoscan-V производства Charles River Endosafe, США. Для построения калибровочной кривой использовали концентрации КСЭ: 0,005; 0,05; 0,5, 5,0 и 50 ЕЭ/мл.



Проверка индикаторов эндотоксина проводилась как «обычных» испытуемых образцов со всеми контролями, несмотря на то, что эти препараты - эндотоксины (но не КСЭ). То есть, для контрольных и обработанных флаконов ставили положительные контроли испытуемых образцов для подтверждения отсутствия мешающих факторов. Определенное в опыте содержание эндотоксинов в положительном контроле испытуемого образца должно быть в рамках допустимой ошибки опыта (50% - 200%).

Выбор степени разведения для раствора в необработанном флаконе и его подготовка.

В растворе, полученном в необработанном флаконе, концентрация эндотоксина должна составлять 2000 ЕЭ/мл. Можно рассчитать разведение по формуле расчета МДР:

$$\text{МДР} = \frac{\text{Содержание эндотоксина в ЕЭ/мл}}{\lambda}$$

В кинетическом анализе значение λ соответствует значению наименьшей концентрации КСЭ, использованной для построения калибровочной кривой. В данном примере $\lambda = 0,005$ ЕЭ/мл. Значение МДР составит:

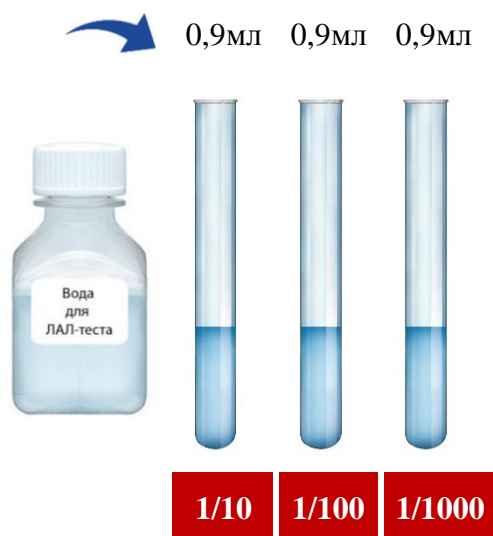
$$\text{МДР} = \frac{2000 \text{ ЕЭ/мл}}{0,005 \text{ ЕЭ/мл}} = 400\ 000$$

Если в растворе концентрация составляет не точно 2000 ЕЭ/мл, а немного меньше, содержание эндотоксина не будет зарегистрировано. Ответ будет – менее 2000 ЕЭ/мл. Такой ответ совершенно не нужен. Он хорош для проверки лекарственных средств, когда надо показать, что эндотоксина меньше установленной нормы.

В ситуации, когда примерно понятно, какую концентрацию можно ожидать, рекомендуется выбирать разведения, в которых концентрация эндотоксина будет ближе к середине калибровочной кривой. В данном случае средняя концентрация равна 0,5 ЕЭ/мл. При использовании этого значения степень разведения будет составлять 1/4000. В таком разведении исходного раствора концентрация эндотоксина должна составить 0,5 ЕЭ/мл. Если же исходная концентрация несколько выше или ниже заявленных производителем 2000 ЕЭ/флакон (концентрация в исходном растворе 2000 ЕЭ/мл), в разведении 1/4000 она будет соответственно выше или ниже 0,5 ЕЭ/мл, но в любом случае она будет определена, так как калибровка охватывает значения от 0,005 ЕЭ/мл до 50 ЕЭ/мл. Из соображений простоты подготовки разведений лучше остановиться на разведении 1/1000. Принципиально ничего не меняется, а готовить такое разведение гораздо проще.

Для подготовки такого разведения было необходимо три пробирки 13x100 мм, которые подписывали следующим образом: 1/10; 1/100; 1/1000.

В каждую пробирку вносили по 0,9 мл воды для ЛАЛ-теста.



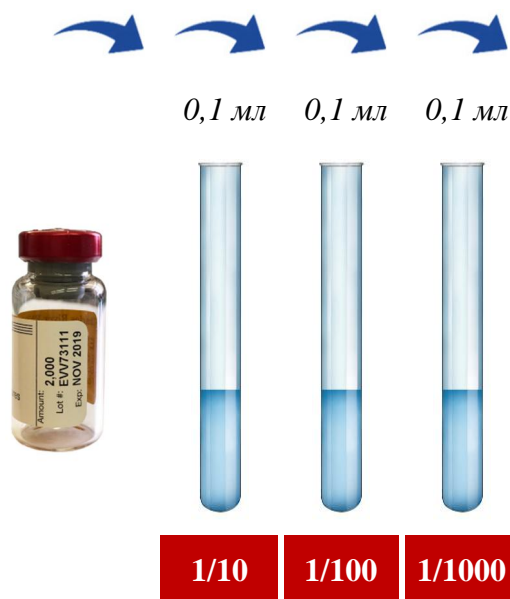
Перед началом приготовления разведений тщательно перемешивали содержимое необработанного флакона с раствором индикатора эндотоксина на вихревой мешалке не менее 60 сек.

Из этого флакона отбирали 0,1 мл раствора и переносили в пробирку **1/10**. Раствор перемешивали на вихревой мешалке в течение 60 сек.

Из пробирки **1/10** отбирали 0,1 мл раствора и переносили в пробирку **1/100**, раствор перемешивали 60 сек.

Из пробирки **1/100** отбирали 0,1 мл раствора и переносили в пробирку **1/1000**, раствор перемешивали 60 сек.





Из получившегося ряда разведений в опыт был поставлен раствор из пробирки **1/1000**.

Выбор степени разведения для раствора в обработанном флаконе.

В растворе, который получен в обработанном флаконе, эндотоксина быть не должно. Поэтому раствор из этого флакона можно проверять без разведения.

Общая схема анализа

Опыт проводили в 96 луночном полистироловом планшете.

Растворы индикаторов эндотоксина, полученные в обработанных и необработанных флаконах, проверяли одновременно на одном планшете и в одно инкубирование.

Анализ проводили по стандартной для кинетических опытов схеме. Для построения калибровочной кривой с диапазоном концентраций КСЭ: 0,005; 0,05; 0,5, 5,0 и 50 ЕЭ/мл в лунки планшета добавляли по 100 мкл каждого раствора КСЭ в двух повторностях. Отрицательный контроль был представлен водой для ЛАЛ-теста, который вносили также по 100 мкл в двух повторностях.

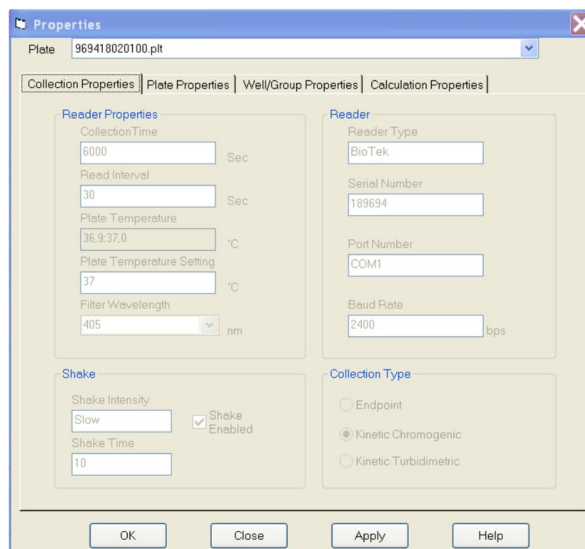
Раствор из необработанного флакона, разведенный до значения 1/1000, вносили в четыре лунки по 100 мкл в каждую, из них в двух лунках находился испытуемый образец, в двух лунках – положительный контроль испытуемого образца.

Положительные контроли испытуемых образцов готовили из раствора КСЭ с концентрацией 5 ЕЭ/мл. В каждую лунку с положительным контролем испытуемого образца добавляли по 10 мкл этого раствора для получения концентрации 0,5 ЕЭ/мл, что соответствовало середине калибровочной кривой. Определенное в опыте содержание эндотоксинов в положительном контроле испытуемого образца должно быть в рамках допустимой ошибки опыта 50% - 200%.

Раствор эндотоксина, полученный в обработанном флаконе, который проверялся без разведения, переносили непосредственно из флакона по 100 мкл в четыре лунки, из них в две лунки в качестве испытуемого образца, в две другие лунки для постановки положительного контроля испытуемого образца.

Положительные контроли испытуемых образцов готовили из раствора КСЭ с концентрацией 5 ЕЭ/мл. В каждую лунку с положительным контролем испытуемого образца добавляли по 10 мкл этого раствора для получения концентрации 0,5 ЕЭ/мл, что соответствовало середине калибровочной кривой.

Измерение проводили при длине волны 405 нм, значение пороговой оптической плотности (OD) было установлено равным 0,1, интервал между измерениями (считываниями значений оптической плотности) составлял 30 сек. Перемешивание планшета перед началом считывания в медленном режиме составляло 10 сек.



В ПО Enodscan-V карта планшета выглядела следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A									STD1	STD1		
B									STD2	STD2		
C									STD3	STD3	ИЭ_ИСХ_1, ИЭ_ИСХ_1,	
D									STD4	STD4	ИЭ_ИСХ_1, ИЭ_ИСХ_1,	
E									STD5	STD5		
F									CTRL1	CTRL1		
G									ИЭ_ОБР	ИЭ_ОБР		
H									ИЭ_ОБР	ИЭ_ОБР		

Серия стандартов обозначена **STD1**; **STD2**; **STD3**; **STD4** и **STD5**, что соответствует концентрациям КСЭ: 0,005; 0,05; 0,5; 5,0 и 50 ЕЭ/мл.

Отрицательный контроль (вода для ЛАЛ-теста) обозначен аббревиатурой **CTRL**.

Раствор индикатора эндотоксина из необработанного флакона, проверяемый в разведении 1/1000, обозначен на схеме **ИЭ_ИСХ_1000**. Положительный контроль для этого раствора (спайк) с концентрацией эндотоксина, равной 0,5 ЕЭ/мл обозначен на схеме так же как и испытуемый образец, но выделен другим цветом - **ИЭ_ИСХ_1/1000**.

Раствор индикатора эндотоксина из обработанного (депирогенизированного) флакона, проверяемый без разведения, обозначен на схеме **ИЭ_ОБР**. Положительный контроль для этого раствора (спайк) с концентрацией эндотоксина, равной 0,5 ЕЭ/мл обозначен на схеме **ИЭ_ОБР**.

Протокол анализа с результатами, полученными для раствора индикатора эндотоксина в разведении 1/1000 из необработанного флакона.

File Name:	969418020100.plt	Lab Name:	ИЛ ООО"НПО"ЛАЛ-Центр"		
Assay Date:	01.02.2018 15:05:18	Onset OD:	0,1		
Collection Mode:	Kinetic Chromogenic	Wavelength Filter:	405		
Type of Curve Fit:	Linear Regression, Avg. Replicates	Reader:	BioTek		
Polynomial Order:	N/A	Temperature:	36,9 : 37,0 °C		
Serial Number:	189694	Operator:	Administrator		
Standard Set	Range	R-Value	Acceptable	Slope	Y-Intercept
STD1:STD5	50 : 0,005	-0,9986	YES	-0,1608	2,9581
LAL Water Lot #:	Пиротест, серия 01012018	Exp:	12.01.2022		
LAL Lot #:	Endochrome - K, серия H1232E	Exp:	11.2018		
Endotoxin Lot #:	Endosafe CSE, серия EX61532	Exp:	06.2019		
Other Lot #:	N/A	Exp:	N/A		
Пробирки:	Пиротест, 13x100 мм	Exp:	-		
Планшет:	Costar, 96-луночный	Exp:	-		
Наконечники:	Sartorius 200, 1000, 5000 мкл	Exp:	-		
Comments:					
Product Name:	ИЭ_ИСХ_1/1000	Test Conc/Dil:	1:1000 mL/mL		
Identifier:	SPL3	Endotoxin Limit:	No Limit		
Product Code:	Charles River Endosafe, США	Pass:	YES		
Product Lot Number:	N/A				
Sample Description:	Исходный раствор препарата 2000 ЕД/мл, разведение 1/1000				
Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%
C11	827,8	809,1	1 778,3366 EU/mL	2 050,0753 EU/mL	2,31
C12	790,3		2 371,2153		
Criteria Computations:					
Name:	SPL3				
Condition:	CV(SPL3.RTIME) < 20%				
Status:	VALID				
Spike Identifier:	SPK3				
Theoretical Spike Value:	0,5				
Spike Recovery:	50 <= SPK3.RY <= 200 : VALID				
Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%
D11	794,5	781,0	2,2952 EU/mL	2,5523 EU/mL	1,72
D12	767,6		2,8436		
Criteria Computations:					
Name:	SPK3				
Condition:	CV(SPK3.RTIME) < 20% AND 50 <= SPK3.RY <= 200				
Status:	VALID				

В колонтитулах отчета приведены общие данные об условиях проведения анализа: название метода, способ обработки данных, длина волны, температура в начале и в конце инкубирования, данные об используемых реактивах и материалах.

Достоверность (линейность) калибровочной кривой определяется по абсолютному значению коэффициента корреляции $|r|$, который должен быть равен или больше 0,980. В опыте коэффициент корреляции составил -0,9986, значение приемлемое (Acceptable – YES).

Раствор индикатора эндотоксина из необработанного флакона, проверяемого в разведении 1/1000, в протоколе обозначен как **ИЭ_ИСХ 1/1000**, в программе ему присвоен идентификатор SPL3.

Значение концентрации в исходном растворе составило 2050,08 ЕЭ/мл. Значение, полностью соответствующее заявленной производителем активности индикатора эндотоксина, – 2000 ЕЭ/флакон. В положительном контроле испытуемого образца (в программе обозначен идентификатором SPK3) получен практически идеальный результат – соответствие ожидаемому значению составило 100%.

Протокол анализа с результатами для раствора эндотоксина, полученного из обработанного флакона.

File Name:	969418020100.plt	Lab Name:	ИЛ ООО"НПО"ЛАЛ-Центр"			
Assay Date:	01.02.2018 15:05:18	Onset OD:	0,1			
Collection Mode:	Kinetic Chromogenic	Wavelength Filter:	405			
Type of Curve Fit:	Linear Regression, Avg. Replicates	Reader:	BioTek			
Polynomial Order:	N/A	Temperature:	36,9 : 37,0 °C			
Serial Number:	189694	Operator:	Administrator			
Standard Set	Range	R-Value	Acceptable	Slope	Y-Intercept	
STD1:STD5	50 : 0,005	-0,9986	YES	-0,1608	2,9581	
LAL Water Lot #:	Пиротест, серия 01012018	Exp:	12.01.2022			
LAL Lot #:	Endochrome - K, серия H1232E	Exp:	11.2018			
Endotoxin Lot #:	Endosafe CSE, серия EX61532	Exp:	06.2019			
Other Lot #:	N/A	Exp:	N/A			
Пробирки:	Пиротест, 13x100 мм	Exp:	-			
Планшеты:	Costar, 96-луночный	Exp:	-			
Наконечники:	Sartorius 200, 1000, 5000 мкл	Exp:	-			
Comments:						
Product Information for Standard Set STD1:STD5						
Product Name:	ИЭ_ОБП	Test Conc/Dil:	1:1 mL/mL			
Identifier:	SPL1	Endotoxin Limit:	No Limit			
Product Code:	Charles River Endosafe, США	Pass:	YES			
Product Lot Number:	N/A					
Sample Description:	Препарат Индикатор эндотоксина 2000ЕЭ после депирогенизации					
Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%	
G9	>2280,0	>2280,0	<0,0050 EU/mL	<0,0050 EU/mL	> 0,00	
G10	>2280,0		<0,0050			
Criteria Computations:						
Name:	SPL1					
Condition:	CV(SPL1.RTIME) < 20%					
Status:	VALID					
Spike Identifier:	SPK1					
Theoretical Spike Value:	0,5					
Spike Recovery:	50 <= SPK1.RY <= 200 : VALID					
Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%	Spike Recovery %
H9	913,4	920,8	0,9644 EU/mL	0,9174 EU/mL	0,80	182
H10	928,1		0,8731			
Criteria Computations:						
Name:	SPK1					
Condition:	CV(SPK1.RTIME) < 20% AND 50 <= SPK1.RY <= 200					
Status:	VALID					

Раствор индикатора эндотоксина из обработанного флакона, проверяемого без разведения, в протоколе обозначен как **ИЭ_ОБР**, и в программе ему присвоен идентификатор SPL1.

Значение концентрации в исходном растворе оказалось менее 0,005 ЕЭ/мл. В положительном контроле испытуемого образца (в программе обозначен идентификатором SPK1) была зарегистрирована концентрация эндотоксина выше ожидаемой и составила 180% от добавленной концентрации КСЭ. Тем не менее этот результат достоверный, поскольку концентрация эндотоксина, определенная для положительного контроля испытуемого образца может находиться в интервале 50% - 200%.

Обработка результатов.

Концентрация эндотоксина в необработанном флаконе составила 2 050,1 ЕЭ/мл

Концентрация эндотоксина в растворе, полученном из обработанного флакона, оказалась менее 0,005 ЕЭ/мл.

$$\log 2\,050 \text{ ЕЭ/мл} = 3,312$$

$$\log 0,005 \text{ ЕЭ/мл} = -2,301$$

$$\text{Степень снижения концентрации эндотоксина} = 3,312 - (-2,301) = 5,613.$$

Степень снижения концентрации индикатора эндотоксина после термической депирогенизации составила 5,6 log. Концентрация эндотоксина снизилась более чем на 5 порядков, при достаточном снижении в три порядка. Эффективность процедуры депирогенизации подтверждена.

4.2. Общие рекомендации по проведению оценки эффективности депирогенизации кинетическими методами

1. Содержание эндотоксина в необработанном флаконе индикатора эндотоксина практически точно соответствует значению, заявленному производителем – 2000 ЕЭ/флакон, хотя в сертификате и написано «примерно 2000 ЕЭ». Это значение можно спокойно использовать для предварительных расчетов степени разведения растворов из необработанных флаконов при проверке любым методом.

2. В калибровочную кривую совершенно не нужно вводить точку 50 ЕЭ/мл. Она избыточна.

3. Можно исключить и точку 0,005 ЕЭ/мл и ставить опыт как он описан в инструкции на индикаторы – с калибровочной кривой 0,05 ЕЭ/мл; 0,5 ЕЭ/мл и 5,0 ЕЭ/мл. В этом случае раствор из необработанного флакона можно будет проверять в разведении 1/100.

Пусть в опыте для необработанного флакона будет получена такая же концентрация, как и в выше приведенном опыте - 2 050,1 ЕЭ/мл. Для обработанного флакона она будет менее 0,05 ЕЭ/мл.

$$\log 2\,050 \text{ ЕЭ/мл} = 3,312$$

$$\log 0,05 \text{ ЕЭ/мл} = -1,301$$

$$\text{Степень снижения концентрации эндотоксина} = 3,312 - (-1,301) = 4,613.$$

Степень снижения концентрации индикатора эндотоксина составит 4,6 log, т.е. будет показано, что концентрация эндотоксина снизилась более чем на 4 порядка. Это вполне соответствует граничным требованиям.

4. Приемлемы оба варианта проверки как с чувствительностью 0,05 ЕЭ/мл, так и с чувствительностью 0,005 ЕЭ/мл. При проверке с использованием калибровочной кривой 0,05 ЕЭ/мл – 5,0 ЕЭ/мл можно показать снижение концентрации эндотоксина более чем в 10 000 раз. Если увеличить чувствительность определения и проводить измерения в диапазоне 0,005 ЕЭ/мл – 5,0 ЕЭ/мл, можно показать снижение концентрации более чем в 100 000 раз. Снижение в 100 000 раз выглядит солиднее, в то же время разведение для чувствительности 0,05 ЕЭ/мл проще готовить, и продолжительность измерений занимает меньше времени. В сущности, при правильно проведенной термической депирогенизации эндотоксины разрушаются полностью и не регистрируются. Минимальное значение определяемой концентрации (если быть точным, то не определяемой концентрации) зависит только от чувствительности опыта (λ).

5. Проверку можно с равным успехом проводить и с помощью кинетического турбидиметрического теста (Метод С). Он проводится на том же оборудовании, измерения можно делать с такими же калибровочными кривыми, как и для кинетического хромогенного теста.

5. ОЦЕНКА ПРОЦЕДУРЫ ДЕПИРОГЕНИЗАЦИИ ГЕЛЬ-ТРОМБ ТЕСТОМ.

Проверка растворов из необработанных и обработанных флаконов индикаторов эндотоксина может быть проведена качественным гель-тромб тестом (Метод А) или количественным гель-тромб тестом (Метод В). В количественном методе можно получить значение концентрации эндотоксина в необработанных флаконах.

Качественный гель-тромб тест представляется наиболее простым и экономичным способом проверки. Несмотря на то, что точного значения концентрации эндотоксина в растворах из необработанных флаконов получено не будет, можно так построить схему анализа, что результат будет полностью удовлетворять основным условиям – будет показано, что концентрация эндотоксина после процедуры депирогенизации снижается как минимум на три порядка.

В любом случае целесообразно использовать ЛАЛ-реактив с высокой чувствительностью: 0,03 ЕЭ/мл или 0,015 ЕЭ/мл. Поскольку при правильно проведенной термической депирогенизации происходит полное разрушение эндотоксина, в обработанных флаконах эндотоксин не будет определяться вообще. В зависимости от выбранного реактива будут получены значения концентрации менее 0,03 ЕЭ/мл или менее 0,015 ЕЭ/мл.

В п. 5.1. приводится подробное описание анализа, проведенного с помощью качественного гель-тромб теста. В п. 5.2. рассматриваются другие возможные варианты и схемы проведения определения эффективности термической депирогенизации с помощью гель-тромб теста.

5.1. Описание подготовки и проведения опыта методом качественной геллотромб-тест

Реактивы и материалы

Анализ проводили с помощью ЛАЛ-реактива Endosafe КТА с чувствительностью 0,015 ЕЭ/мл. В опыте использовали контрольный стандарт эндотоксина, КСЭ E.coli 055:B5 производства Charles River Endosafe, США, воду для ЛАЛ-теста «Пиротест», пробирки для разведения 13x100 мм и пробирки для анализа 10x75 мм производства ООО «НПО «ЛАЛ-Центр».

Также в испытаниях использовали: дозаторы электронные и механические, вихревые мешалки. Инкубирование реакционных смесей проводили в испытательном оборудовании - термостате твердотельном DVH производства ИКА, Германия.



Выбор степени разведения раствора эндотоксина, полученного в необработанном флаконе, и его подготовка.

При проведении качественного анализа встает вопрос выбора степени разведения, в котором будут проверены растворы из необработанных флаконов. Концентрация раствора эндотоксина после разведения флакона 1 мл воды для ЛАЛ-теста согласно сертификату производителя, должна быть равна (около) 2 000 ЕЭ/мл. Можно рассчитать максимальное разведение по стандартной формуле расчета МДР:

$$\frac{2000 \text{ ЕЭ/мл}}{0,015625 \text{ ЕЭ/мл}} = 128\ 000$$

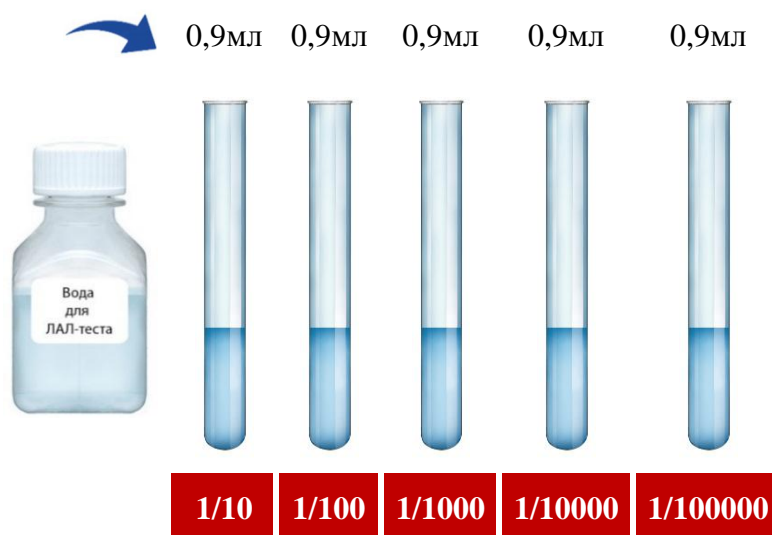
Значение 0,015625 ЕЭ/мл соответствует реальной чувствительности ЛАЛ-реактива, обычно это значение округляется до третьего знака после запятой, но использование в расчетах реального значения чувствительности позволяет получать более точные цифры.

Если мы разведем исходный раствор эндотоксина в 128 000 раз, то концентрация в этом разведении будет соответствовать чувствительности ЛАЛ-реактива, и в результате анализа в этой пробе должен быть получен «плюс». Но принимая во

внимание возможную ошибку опыта, и тот факт, что эти индикаторы эндотоксина калибровались другой серией ЛАЛ-реактива, можно ожидать и получение «минуса» в пробе, тогда анализ надо будет переставлять в меньшем разведении. Поэтому в опыт было поставлено разведение 1/100 000. В этом разведении должен гарантированно получиться плюс, по результатам можно будет говорить, что концентрация раствора эндотоксина из необработанного флакона больше или равна 1 562,5 ЕЭ/мл. Этого вполне достаточно. Дополнительным плюсом является простота приготовления такого разведения.

Для подготовки такого разведения было необходимо пять пробирок 13x100 мм. Их подписывали следующим образом: 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000; 1/100000.

В каждую пробирку вносили по 0,9 мл воды для ЛАЛ-теста.

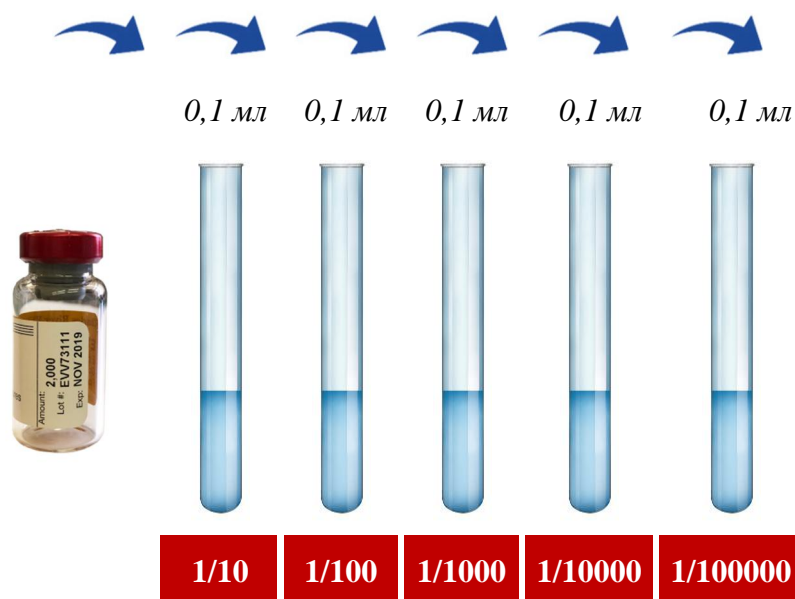


Перед началом приготовления разведений тщательно перемешивали содержимое необработанного флакона с раствором индикатора эндотоксина на вихревой мешалке не менее 60 сек.

Из флакона отбирали 0,1 мл раствора и переносили в пробирку **1/10**. Раствор перемешивали на вихревой мешалке в течение 60 сек.



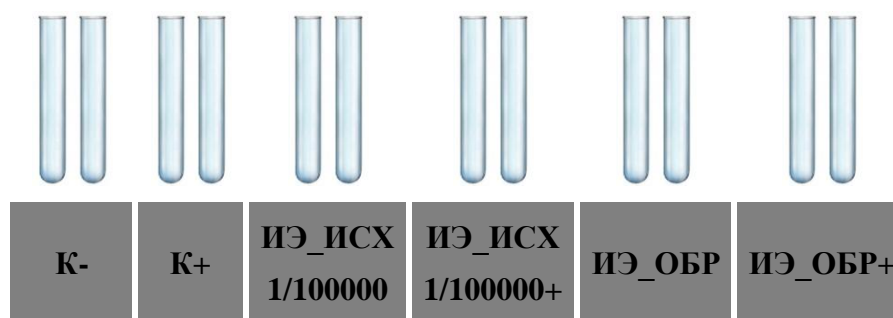
Из пробирки **1/10** отбирали 0,1 мл раствора и переносили в пробирку **1/100**, раствор перемешивали 60 сек. Эту процедуру повторяли для пробирок **1/1000–1/100000**, каждый раз перемешивая получившийся раствор в течение 60 сек.



Из получившегося ряда разведений в опыт был поставлен раствор из пробирки **1/100000**.

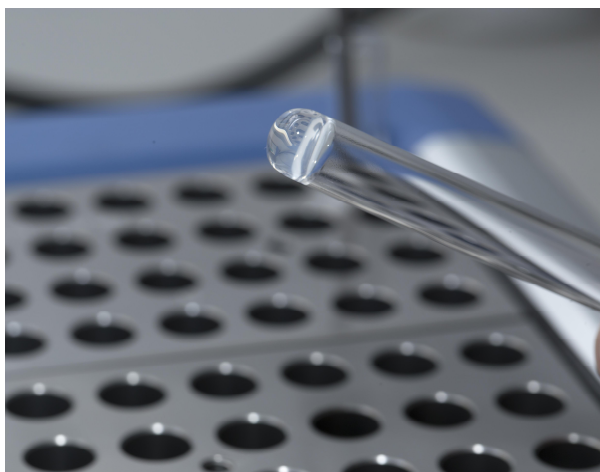
Общая схема анализа.

Для проведения опыта было необходимо 12 пробирок 10x75 мм, которые подписывали следующим образом:



Маркировка	Назначение раствора	Количество повторностей
K-	Отрицательный контроль	2
K+	Положительный контроль	2
ИЭ_ИСХ 1/100000	Раствор индикатора эндотоксина из контрольного флакона	2
ИЭ_ИСХ 1/100000+	Положительный контроль раствора индикатора эндотоксина из контрольного флакона	2
ИЭ_ОБР	Раствор индикатора эндотоксина из флакона, прошедшего депирогенизацию	2
ИЭ_ОБР+	Положительный контроль раствора индикатора эндотоксина из флакона, прошедшего депирогенизацию	2

Анализ проводился по стандартной схеме проведения гель-тромб теста. Положительные контроли испытуемых образцов для пробирок **ИЭ_ОБР+** и **ИЭ_ИСХ_1/100000+** готовили путем добавления в каждую пробирку по 10 мкл раствора КСЭ с концентрацией 0,3 ЕЭ/мл (20 λ), концентрация КСЭ в этих пробирках была равна 0,03 ЕЭ/мл, т.е. соответствовала стандартному значению для положительного контроля - 2 λ.



Во все пробирки добавляли ЛАЛ-реактив и инкубировали один час при температуре 37°C. Инкубирование реакционных смесей проводили в термоблоке. После инкубирования оценивали результаты как положительные – образование геля, который не разрушается при переворачивании пробирки на 180°, и отрицательные – отсутствие изменений в реакционной смеси.

Результаты опыта, полученные методом А.

ИЭ_ИСХ 1/100000	ИЭ_ИСХ 1/100000 +	ИЭ_ОБР 1/1	ИЭ_ОБР 1/1+	К-	К+
+	+	-	+	-	+
+	+	-	+	-	+

Обработка результатов.

Концентрация эндотоксина в разведении 1/100000 составила:

$$0,015625 \text{ ЕЭ/мл} \times 100\ 000 = 1\ 562,5 \text{ ЕЭ/мл.}$$

На самом деле концентрация эндотоксина в растворе из необработанного флакона больше или равна полученному значению, но в расчетах будет использоваться концентрация 1 562,5 ЕЭ/мл.

Концентрация эндотоксина в растворе, полученном из обработанного флакона, оказалась менее 0,015625 ЕЭ/мл.

$$\log 1\ 562,5 \text{ ЕЭ/мл} = 3,194$$

$$\log 0,015625 \text{ ЕЭ/мл} = -1,806$$

Степень снижения концентрации эндотоксина = $3,194 - (-1,806) = 5,0$.

Концентрация эндотоксина снизилась на 5 log или на пять порядков, при достаточном снижении на три порядка. Эффективность процедуры депирогенизации подтверждена.

Можно и не прибегать к логарифмам, а просто узнать, во сколько раз снизилась концентрация эндотоксина:

Исходная концентрация больше 1 562,5 ЕЭ/мл.

После обработки концентрация стала меньше 0,015625 ЕЭ/мл.

Рассчитываем отношение того, что было к тому, что стало:

$$\frac{1\,562,5 \text{ ЕЭ/мл}}{0,015625 \text{ ЕЭ/мл}} = 100\,000$$

В результате обработки концентрация эндотоксина снизилась более чем в 100 000 раз, при том, что достаточным считается снижение концентрации в 1000 раз.

5.2. Другие варианты определения концентрации эндотоксинов с помощью гель-тромб теста.

Использование ЛАЛ-реактива с другой чувствительностью.

Что будет, если использовать ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл (0,03125 ЕЭ/мл)? Чувствительность реактива в два раза меньше, соответственно, значение МДР будет тоже меньше в два раза – 64 000. Целесообразно будет проводить проверку в разведении 1/50 000. Ожидаемые результаты:

Концентрация эндотоксина в разведении 1/50000 так же, как и в первом случае будет более или равна 1 562,5 ЕЭ/мл (0,03125 ЕЭ/мл x 50 000).

Концентрация эндотоксина в растворе, полученном из обработанного флакона будет менее 0,03125 ЕЭ/мл.

$$\log 1\,562,5 \text{ ЕЭ/мл} = 3,194$$

$$\log 0,03125 \text{ ЕЭ/мл} = -1,505$$

Степень снижения концентрации эндотоксина = $3,194 - (-1,505) = 4,7$.

Или

$$\frac{1\,562,5 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 50\,000$$

Будет зарегистрировано снижение концентрации эндотоксина в 50 000 раз. Это тоже соответствует требованиям к правильно проведенной депирогенизации.

Можно примерно рассчитать, какие результаты будут получены при использовании ЛАЛ-реактивов меньшей чувствительности.

Так, для реактива с чувствительностью 0,06 ЕЭ/мл можно ожидать, что зарегистрированное снижение концентрации эндотоксина составит 4,4 log.

Если использовать ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,125 ЕЭ/мл, снижение составит 4,1 log.

Даже при использовании реактива с наименьшей чувствительностью 0,25 ЕЭ/мл можно ожидать, что снижение составит 3,8 log, т.е. результаты будут вполне приемлемые.

Таким образом, качественный гель-тромб тест хотя и не дает возможности определить точное исходное содержание эндотоксина в контрольном (не обработанном) флаконе индикатора эндотоксина, оказывается вполне пригодным инструментом для подтверждения эффективности депирогенизации, проведенной термическим способом. Конечно, лучше использовать реактивы с высокой чувствительностью, но желаемый результат может быть получен с ЛАЛ-реактивом любой чувствительности. Дополнительным плюсом оказываются простота пробоподготовки и малые затраты реактива на проведение анализа.

Проведение проверки количественным гель-тромб тестом (Методом В).

При желании можно точно определить содержание эндотоксина в необработанных флаконах с помощью количественного гель-тромб теста. Правда общая схема анализа будет комбинированной. Проводить количественное определение содержания эндотоксинов для флаконов, прошедших депирогенизацию, дело бессмысленное, все равно содержание эндотоксина будет ниже чувствительности метода. Таким образом, схема опыта будет включать количественное определение для необработанных флаконов и качественное определение для обработанных флаконов. Получается гибридная схема. Методы А и В ставятся одновременно, и возможно, в

одном инкубировании. Можно разобрать гипотетический вариант, например, с использованием ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,015 ЕЭ/мл. Как было показано ранее, МДР будет составлять 128 000. Для количественного определения концентрации эндотоксина надо поставить несколько разведений (от трех до пяти), близких к МДР. Например,

Максимально широкий ряд разведений:

1/32000; 1/64000; 1/128000; 1/256000; 1/512000

Минимальный ряд:

1/64000; 1/128000; 1/256000

При постановке опыта в процедуру количественного определения придется внести изменения. Положительный контроль испытуемого образца необходимо будет ставить для каждого разведения, а не только для наименьшего, как описано в схеме анализа в ОФС. В противном случае нельзя будет утверждать, что исследуемые растворы не содержат мешающих факторов.

Предположим, что в разведениях до 1/128000 включительно будут получены положительные результаты, в больших разведениях результаты будут отрицательными.

Концентрация эндотоксина в растворе из необработанного флакона будет равна:

$$0,015625 \text{ ЕЭ/мл} \times 128\,000 = 2000 \text{ ЕЭ/мл.}$$

Концентрация эндотоксина в растворе, полученном из обработанного флакона, будет меньше 0,015625 ЕЭ/мл.

$$\log 2\,000 \text{ ЕЭ/мл} = 3,301$$

$$\log 0,015625 \text{ ЕЭ/мл} = -1,806$$

$$\text{Степень снижения концентрации эндотоксина} = 3,301 - (-1,806) = 5,11.$$

В таком опыте будет определено точное значение содержания эндотоксина в необработанном флаконе, и по результатам анализа степень снижения исходного содержания эндотоксина будет несколько выше, чем в первом примере. Однако, никакого принципиального значения это не имеет. Практически во всех разобранных примерах будет показано, что после термической обработки происходит снижение содержания эндотоксина гораздо больше, чем в 1000 раз.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Для оценки эффективности термической депирогенизации следует использовать индикаторы эндотоксина для прямой валидации.

2. Анализ подготовленных растворов из необработанных и обработанных флаконов можно проводить следующими методами:

Качественным гель-тромб тестом (Метод А)

Количественным гель-тромб тестом (Метод В)

Кинетическим турбидиметрическим методом (Метод С)

Кинетическим хромогенным методом (Метод D).

3. Желательно, чтобы чувствительность реактива/метода составляла 0,005 ЕЭ/мл – 0,03 ЕЭ/мл.

4. Любым из перечисленных методов можно показать снижение концентрации эндотоксина в 50 000 -100 000 раз. Этого более чем достаточно для подтверждения эффективности процедуры депирогенизации.

5. Ни один из перечисленных методов не может считаться однозначно предпочтительным. Качественный гель-тромб тест прост в подготовке и не требует специального оборудования. Кинетические анализы могут точно определить концентрацию эндотоксина в необработанном и обработанном (если что-то осталось) флаконах.

Единственным преимуществом кинетических анализов является возможность одновременного проведения анализов для большого количества образцов одновременно. В приведенных выше примерах исследовались по одному необработанному и обработанному флакону. В этом случае гель-тромб тест более предпочтителен. При реально проводимой валидации технологического оборудования в одном цикле депирогенизации может быть использовано от нескольких единиц до нескольких десятков депирогенизированных флаконов и несколько единиц контрольных, необработанных флаконов. В этом случае кинетические анализы оказываются более предпочтительными, поскольку на одном планшете в одно инкубирование можно поставить до 20 испытуемых образцов. Проведение такого большого количества анализов гель-тромб тестом займет гораздо больше времени.

6. Из широкого спектра выпускаемых препаратов индикаторов эндотоксина для валидации термической депирогенизации лучше всего подходят индикаторы эндотоксина с содержанием эндотоксина 2000 ЕЭ/флакон.