

# ЛАЛ-тест

№4. 2003

*Уважаемые коллеги!*

*Очередной номер нашего бюллетеня целиком посвящен стандартам эндотоксина, используемым при проведении ЛАЛ-теста. В основной статье номера мы предлагаем общий обзор существующей системы стандартизации метода, которая также включает ретроспективный взгляд на историю становления Международного стандарта эндотоксина, что может помочь понять, как сложился сегодняшний порядок вещей. Мы считаем, что необходимо коснуться и той фундаментальной работы, которая была проделана в течение многих лет, и результатом которой стали привычные сегодня значения пороговой пирогенной дозы. Вторая часть выпуска посвящена практическим проблемам, с которыми мы, пользователи ЛАЛ-теста, сталкиваемся ежедневно. Это и выбор препарата КСЭ, и правила работы с ним.*

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

## *Стандарты эндотоксина*

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

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

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

## *Международный стандарт эндотоксина и Национальный стандарт эндотоксина США*

Бактериальные эндотоксины проявляют широкий спектр биологической активности, в данном случае наибольший интерес представляет способность эндотоксинов вызывать гелирование ЛАЛ-реактива и пирогенную реакцию у млекопитающих. Активность препаратов эндотоксина зависит не только от его природы (микроорганизма-производителя), но и от степени и способа его очистки, а также от свойств раствора, в котором он находится. Например, один из первых стандартов, претендовавших на

роль международного стандарта, при сравнении его активности посредством двух разных коммерческих ЛАЛ-реактивов демонстрировал активность, равную 3,32 ЕЭ/нг в тесте с ЛАЛ-реактивом «Pyrogent» и 1,05 ЕЭ/нг в тесте с ЛАЛ-реактивом «Pyrotell». В данном случае наблюдается разная способность одного и того же препарата эндотоксина вызывать гелирование различных коммерческих ЛАЛ-реактивов (1). Еще большей вариабельность результатов может быть для препаратов эндотоксина, полученных из разных микроорганизмов. Очевидно, что для полноценного использования ЛАЛ-теста необходимо было создать условия, позволяющие стандартизовать результаты анализов, проводимых в разных лабораториях и с разными ЛАЛ-реактивами. Для этого нужно было ввести единый стандарт эндотоксина. Несмотря на очевидность и сравнительную ясность постановки проблемы, решение ее оказалось далеко не простым делом и затянулось почти на двадцать лет. Первые работы по производству такого стандарта были начаты в США еще в 70-х годах. В конечном счете они привели к созданию Национального стандарта фармакопеи США, которому затем был присвоен международный статус.

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

представления о том, каким должен быть идеальный препарат эндотоксина. Среди наиболее желательных характеристик были:

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

Следующая серия - ЕС-2 состояла примерно из 1200 флаконов. Этот стандарт соответствовал большинству требований, предъявляемых FDA к стандарту эндотоксина, и был принят в качестве Национального стандарта Эндотоксина США - RSE (US Reference Standard Endotoxin) (3). Интересно, что предметом критики первого стандарта было то, что *Klebsiella pneumoniae* не является частой причиной загрязнения фармацевтических препаратов. Но и *Escherichia coli*, в этом смысле, является не на много более удачным выбором. Более вероятной причиной загрязнений фармацевтических препаратов являются микроорганизмы – загрязнители систем очистки воды (*Pseudomonas* и др.). Возможно, на выбор бактерии-продуцента эндотоксина повлияло то, что в то время ЛАЛ-тест предполагалось использовать и для диагностики заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями. По-видимому, это объясняет причину, по которой в качестве стандарта эндотоксина решено было использовать сначала *Klebsiella pneumoniae*, а затем *E.coli*. (4).

Стандарт ЕС-2 просуществовал до 1 июля 1980 года. Большая часть серии была потрачена на эксперименты по установлению значения пороговой пирогенной дозы. Предполагалось, что следующая партия, приготовленная по той же технологии и из той же субстанции, будет адекватной заменой серии ЕС-2. Однако, следующая серия оказалась неудачной. Неудачной была и серия ЕС-4, активность которой была примерно в четыре раза ниже активности ЕС-2. И только характеристики серии ЕС-5, приготовленной в 1981 году, оказались удачными. В этом же году совместными усилиями FDA и трех производителей ЛАЛ-

реактива было введено значение единицы эндотоксина (*Endotoxin Unit, EU*), равное 0,2 нг эндотоксина ЕС-2. Переход на единицы эндотоксина упростил процедуру принятия нового стандарта ЕС-5, активность которого можно было выражать уже не в весовых, а в относительных единицах. Активность ЕС-5 была установлена в исследовании, в котором участвовали 14 лабораторий. Новый стандарт оказался примерно в 2,1 раза активнее ЕС-2 (этот факт лишний раз подчеркивает сложности, с которыми приходится сталкиваться при стандартизации препаратов эндотоксина, ведь все партии от ЕС-1 до ЕС-6 готовили из одного и того же сырого препарата ЛПС и по одной технологии очистки и сушки). После пересчета активности нового стандарта было решено считать, что содержание эндотоксина в одном флаконе составляет 10000 ЕЭ. Именно это значение и стали указывать на его этикетке (5,6,7).

В середине 80-х годов ЛАЛ-тест получил международное признание, и началось его включение в национальные фармакопеи. Одновременно началась и история Международного стандарта эндотоксина. Метод проведения анализа, включаемый в Фармакопеи, был в основном аналогичен методу, описанному в Американской фармакопее (в начале 80-х годов основным фармакопейным методом был гель-тромб тест). Во многом это объяснялось тем, что ЛАЛ-реактив, предназначенный для проведения фармакопейных анализов, производился (и производится в настоящее время) в США. В отношении же контрольных стандартов эндотоксина казалось, что свобода выбора гораздо шире. Естественно появилось множество национальных стандартов эндотоксина, но, как отмечалось выше, разные препараты эндотоксина могут проявлять разную активность. Поэтому, одновременное существование нескольких стандартов приводило к необходимости перекалибровывать ЛАЛ-реактив по разным препаратам эндотоксина. Совершенную сумятицу могла вызвать и вариабельность реакции разных стандартов и разных ЛАЛ-реактивов, и невозможность установления истины в спорных случаях (арбитраж). Очевидно, что такое положение дел не могло долго оставаться неизменным. Необходимость унификации результатов анализа привела к созданию Международного стандарта эндотоксина.

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

Даже после появления Международного стандарта Национальный стандарт эндотоксина США (RSE) оставался основным стандартом эндотоксина, поскольку по нему калибровались коммерческие ЛАЛ-реактивы, предназначенные для разных анализов. Все более широкое применение фотометрических методов проведения ЛАЛ-теста стимулировало разработку нового международного стандарта, который можно было бы использоваться для всех типов анализов. Такой стандарт появился благодаря совместным усилиям ВОЗ и FDA.

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

Принятие МС оказалось очень важным шагом еще и потому, что открыло возможность гармонизации процедур проведения анализа, что нашло свое отражение через три года в принятии гармонизированной версии фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины». Новая редакция статьи была одновременно принята фармакопеями США, Японии и Европейской фармакопеей. В новой статье указано, что все результаты выражаются в единицах международного стандарта (неважно, как они обозначаются EU или IU). Тогда же в 2000 году была принята и новая отечественная статья «Бактериальные эндотоксины» (ОФС 42-0002-00). В ней так же в качестве стандарта эндотоксина был принят Международный стандарт.

Приготовленная партия Международного стандарта состояла примерно из 60 тысяч флаконов. Это была самая большая серия за всю историю производства стандартов эндотоксина. Но и такого большого количества недостаточно

Табл.1 Организации, принявшие  
Международный стандарт эндотоксина.

Организация, принявшая стандарт	Год принятия	Название	Микро-организм	Ед. активности
ВОЗ	1996	IS-2	<i>E. coli 0113:H10</i>	IU
FDA	1995	ЕС-6	<i>E. coli 0113:H10</i>	EU
Фармакопея США	1995	Lot G	<i>E. coli 0113:H10</i>	EU
Европейская Фармакопея	1997	BRP-3	<i>E. coli 0113:H10</i>	IU

для удовлетворения потребностей всех работающих с ЛАЛ-реактивом. Поэтому, учитывая ограниченность партии этого стандарта, его назначение сводится к стандартизации ЛАЛ-реактива, КСЭ и, при необходимости, он используется при решении спорных вопросов для проведения арбитражных анализов.

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

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

#### Контрольные стандарты эндотоксина.

Для проведения контроля в ходе повседневных анализов используются препараты эндотоксина, которые называются Контрольными

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

Контрольным стандартом может быть практически любой препарат эндотоксина при условии, что он отвечает определенному набору

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

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

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

при использовании КСЭ и ЛАЛ-реактивов от разных производителей.

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

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

Как уже упоминалось выше, основные функции КСЭ сводятся к валидации рутинных анализов. При проведении анализа необходимо контролировать способность ЛАЛ-реактива реагировать с эндотоксинами, которые могут содержаться в растворе лекарственного препарата для этого в качестве модели используется препарат КСЭ, который позволяет:

- 1) Убедиться в том, что реактив не потерял своей чувствительности при хранении и транспортировке и после разведения;
- 2) Убедиться в том, что при проведении анализа соблюдаются все необходимые условия проведения реакции;
- 3) Убедиться в том, что эндотоксин в испытуемом растворе способен реагировать с ЛАЛ-реактивом также как и в водном растворе.

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

Но функции КСЭ не исчерпываются перечисленными задачами. Стандарт эндотоксина может использоваться и для валидации процедур депирогенизации, и для валидации технологического оборудования. Очень важно

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

При оценке эффективности процедуры депирогенизации или технологии получения изделия медицинского назначения стандарт эндотоксина используется как модель загрязнения. Оценка содержания эндотоксина до и после обработки позволяет оценить эффективность оборудования, используемого для депирогенизации. Для решения этих задач могут использоваться препараты КСЭ, содержащие ЛПС в десятки или сотни раз больше, чем стандартные препараты, используемые при проведении фармакопейного анализа. В каталогах компаний-производителей они часто называются «Стандартами эндотоксина для валидации депирогенизации».

### **Заключение.**

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

операция может привести к полному разрушению существующей структуры контроля бактериальных эндотоксинов, и целесообразность такого действия далеко неочевидна.

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

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

#### *Литература.*

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

### Краткий обзор Контрольных стандартов эндотоксина, используемых при проведении гель-тромб теста.

Ситников А.Г., Долгова Г.В.

Если попытаться классифицировать препараты КСЭ, используемые при проведении ЛАЛ-теста, то можно выделить несколько признаков, которые могут оказаться сколь угодно значимыми для пользователя:

- а) Штамм (серотип) бактерии, из которой был получен очищенный препарат ЛПС;
- б) Форма выпуска препарата (лиофилизат или раствор);
- в) Концентрация эндотоксина в основном растворе, выраженная в ЕЭ/мл;
- г) Назначение для использования.

Первый пункт классификации представляет интерес научный и никак не отражается на сроках хранения и прочих важных для исследователя характеристиках. Сразу отметим, что используются при проведении ЛАЛ-теста, как правило, препараты, полученные из *Escherichia coli* двух разных штаммов – *E.coli* 055:B5 или *E.coli* 0113:H10.

По второму пункту тоже вариантов выбора не очень много, практически все препараты ЛПС представляют собой лиофилизат, из которого готовится раствор КСЭ непосредственно на месте его использования. Исключение составляет недавно появившийся набор реактивов “*Pyrogen Ultra*” производства компании *Biowhittaker Inc*, США. Набор этот рассчитан на 200 определений и состоит из 4 флаконов ЛАЛ-реактива и 5 флаконов с готовыми растворами КСЭ концентраций 0,25λ, 0,5λ, λ, 2λ и 20λ. Возможность работать с уже готовыми растворами КСЭ, да еще и с набором готовых для анализа разведений, выглядит заманчиво. Срок хранения готовых растворов КСЭ сопоставим со сроками хранения лиофилизированных препаратов. Интересно и то, что вскрытые флаконы с растворами КСЭ хранить можно не более одного месяца, т.е. столько же, сколько и растворы, приготовленные из лиофилизированного препарата.

Такой набор будет полезен исследователям, которые делают небольшое

количество анализов и могут уложиться в 4 флакона ЛАЛ-реактива в месяц. С другой стороны, при постоянной работе ежедневная подготовка растворов КСЭ не представляет никаких трудностей и может рассматриваться как необходимая практика и самоконтроль.

Третий пункт нашей классификации – концентрация эндотоксина в исходном растворе КСЭ. По этому параметру препараты разных производителей могут сильно отличаться друг от друга. Так свежеприготовленный раствор КСЭ производства компании “*Associates of Cape Cod Inc*”, США имеет, как правило, концентрацию (активность), равную 1000 ЕЭ/мл. Аналогичный препарат производства компании *Biowhittaker Inc*, США, напротив, имеет концентрацию всего 20 ЕЭ/мл. Нельзя сказать, что это отличие имеет принципиальное значение. Сроки хранения разведенных препаратов одинаковые, объемы тоже (5 мл), расход на проведение анализов и в том и в другом случае минимальный. Обычно к моменту истечения срока годности КСЭ во флаконе еще остается 2-3 мл концентрированного раствора. Разница заключается лишь в схеме подготовки рабочих растворов: для более концентрированного раствора серия разведений должна включать несколько дополнительных шагов разведений исходного раствора КСЭ (доведение концентрации от 1000 ЕЭ/мл до 10 ЕЭ/мл). Очевидно, что это не может оказать серьезного влияния на скорость работы или на расход воды и пр.

Четвертый пункт, пожалуй, наиболее важен. Препарат КСЭ может быть предназначен не только для проведения анализа содержания БЭ в лекарственном препарате, но и для валидации процедуры депирогенизации. Для валидации депирогенизации могут потребоваться препараты, содержащие ЛПС в десятки или сотни раз больше, чем обычные препараты КСЭ, используемые в фармакопейном анализе. Специально для валидации депирогенизации могут выпускаться целые наборы КСЭ. Это обстоятельство надо иметь в виду при заказе реактивов для проведения анализа.

Таким образом, все перечисленные параметры, за исключением назначения к использованию, не могут считаться принципиально важными для пользователя. В действительности, выбирают не КСЭ, а ЛАЛ-реактив. Выбрав торговую марку ЛАЛ-реактива,

мы выбираем (косвенно) и препарат КСЭ, предназначенный для анализа с этим реактивом. Необходимо подчеркнуть, что речь идет именно о торговой марке (например, *Endosafe*® или *Pyrogen*®), чувствительность ЛАЛ-реактива в данном случае не имеет значения, так как с ЛАЛ-реактивами разной чувствительности используют один и тот же препарат КСЭ. Детализация важна на уровне серий ЛАЛ-реактива и КСЭ. Каждой серии ЛАЛ-реактива должен соответствовать КСЭ определенной серии. Возможность взаимного использования препаратов должна быть подтверждена сертификатом производителя.

Справедливости ради надо отметить, что потребительские свойства ЛАЛ-реактивов разных торговых марок также мало отличаются друг от друга, как и потребительские свойства разных препаратов КСЭ. Поэтому, можно сначала выбрать препарат КСЭ, свойства которого кажутся наиболее привлекательными и,

соответственно, выбор КСЭ будет диктовать выбор ЛАЛ-реактива.

Ниже приведены краткие характеристики нескольких препаратов КСЭ, поставляемых разными производителями. Информация приводится по материалам рекламных листов компаний и по информации, изложенной на сайтах компаний. Приведенный перечень далеко не полон, в нем приведены только препараты КСЭ, поставляемые с флаконами ЛАЛ-реактива для геля-тромб теста на 10-50 определений (от 1,0 до 5,0 мл/флакон). В перечень включены каталожные номера, названия и краткая информация о препаратах КСЭ.

Более полную информацию о предлагаемых производителями препаратов КСЭ можно найти на сайтах этих компаний.

#### **Associates of Cape Cod**

**E0005** *E.coli O113:H10, 0.5 мкг/флакон* - Контрольный стандарт эндотоксина, предназначенный для использования в фармакопейном анализе, он же может использоваться для валидации процедуры депирогенизации.

**E0125** *E.coli O113:H10, 125 мкг/флакон* - Контрольный стандарт эндотоксина, предназначенный для валидации процедуры депирогенизации.

#### **BioWhittaker (Cambrex Corporation).**

**N186** Набор из 5 флаконов КСЭ *E.coli 055:B5 10 нг/флакон* - Контрольный стандарт эндотоксина, предназначенный для использования в фармакопейном анализе, он же может использоваться для валидации процедуры депирогенизации. Этот же препарат КСЭ входит в наборы:

- **Pyrogen plus**, состоящий из нескольких флаконов ЛАЛ-реактива и одного флакона КСЭ *E.coli 055:B5 10 нг/флакон*;

- **Pyrogen Ultra**, рассчитанный на 200 определений, включающий 5 флаконов готовых растворов КСЭ *E.coli 055:B5* в концентрациях 20λ, 2λ, λ, 0,5λ, 0,25λ. Набор включает готовые растворы стандарта эндотоксина, предназначен для проведения фармакопейных анализов.

**N185** Набор из 5 флаконов КСЭ *E.coli 055:B5 2,5 мкг/флакон* - Контрольный стандарт эндотоксина, предназначенный для валидации процедуры депирогенизации.

**N187** Набор из 25 флаконов КСЭ *E. coli 055:B5 содержание БЭ > 1000 ЕЭ/флакон* для валидации – Набор контрольных стандартов, предназначенных для валидации процедуры сухо-жаровой депирогенизации.

#### **Charles River Endosafe**

**E120** Контрольный стандарт эндотоксина *E.coli 10 нг/флакон* - Контрольный стандарт эндотоксина, предназначенный для использования в фармакопейном анализе.

**E110** Контрольный стандарт эндотоксина *E.coli 500 нг/флакон* - Контрольный стандарт эндотоксина, предназначенный для использования в фармакопейном анализе, он же может использоваться для валидации процедуры депирогенизации.

### *Новости*

ЛАЛ-Центр и Учебный центр Государственного Научного Центра по Антибиотикам начинают совместную программу обучения «**Контроль качества инъекционных лекарственных средств по показателю «Бактериальные эндотоксины» с помощью ЛАЛ-теста**». Программа обучения состоит из цикла семинаров разной степени сложности, участие в которых определяется уровнем подготовки слушателей. Каждый семинар включает лекционную часть и практическую часть. Семинары предназначены для специалистов фармацевтических производств, научно-исследовательских и контрольно-аналитических лабораторий. Целью курса является подготовка слушателей к самостоятельному использованию современного метода определения содержания бактериальных эндотоксинов.

Два первых семинара целиком посвящены гел-тромб тесту, их назначение - формирование базовых знаний и умений работы с методом. Эти семинары дополняют друг друга, но учебные планы составлены таким образом, что каждый из них является самостоятельным и законченным практикумом. Участие во втором семинаре предполагает, что слушатели уже ориентируются в вопросах, рассматриваемых на первом семинаре.

Практические занятия проводятся в специализированной лаборатории, продолжительность занятий два рабочих дня. Занятия будут проводиться по мере формирования учебных групп, состоящих из 4-8 слушателей. Сроки проведения семинаров согласуются со слушателями. По окончании семинаров слушателям выдается Сертификат специалиста, который подтверждает повышение квалификации.

**Семинар №1 «Бактериальные эндотоксины. Проведение контрольных анализов в соответствии с требованиями ОФС 42-0002-00».**

#### **Основные теоретические вопросы:**

- ЛАЛ-тест - общие сведения;
- Материалы и оборудование, используемые при проведении анализа;
- Результаты и их интерпретация, расчет концентрации бактериальных эндотоксинов;
- Подготовка испытуемых образцов, расчет Максимально допустимого разведения испытуемого препарата;
- Правила проведения качественного и количественного анализов;
- Основные проблемы, возникающие при проведении гел-тромб теста, возможные ошибки и пути их преодоления.

#### **Опыты, проводимые на семинаре:**

- Проведение анализа «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива»;
- Количественный анализ – определение содержания бактериальных эндотоксинов в неизвестном образце;
- Качественный анализ – проверка испытуемого препарата в максимально допустимом разведении.

**Семинар №2. «Введение раздела «Бактериальные эндотоксины» в Фармакопейную статью предприятия. Валидация метода».**

#### **Основные теоретические вопросы:**

- План проведения валидации анализа для лекарственного средства;
- Правила расчета и обоснования значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов;
- Проблема ингибирования реакции со стороны испытуемого препарата;
- Назначение и правила проведения предварительных анализов;
- Анализ «Мешающие факторы» - валидация метода;
- Программа контроля качества препарата по показателю «Бактериальные эндотоксины» на предприятии. Контрольные анализы и внутрипроизводственный контроль.

#### **Опыты, проводимые на семинаре:**

- Предварительные анализы, часть 1 - примерная оценка содержания бактериальных эндотоксинов и ингибирования;
- Предварительные анализы, часть 2 – определение степени разведения препарата для проведения анализа «Мешающие факторы»;
- Анализ «Мешающие факторы» для одной серии препарата;  
Отработка технологии проведения контрольных анализов.

**Темы специализированных семинаров, проведение которых планируется в 2004 году.**

В дальнейшем мы планируем проведение ряда специализированных семинаров, предназначенных для тех, кто уже владеет методом. Одной из задач этой программы является обучение инструментальным методам проведения анализа. Другое направление специализации

может быть связано с особенностями применения анализа для конкретных задач. Например, для проверки определенных групп лекарственных препаратов. Интересным представляется и вопрос использования ЛАЛ-теста для проверки качества изделий медицинского назначения.

**Тема семинара: «Инструментальные методы определения бактериальных эндотоксинов. Турбидиметрический кинетический тест».**

Цель занятий – познакомить слушателей с практически неизвестным у нас кинетическим турбидиметрическим методом проведения ЛАЛ-теста. Теоретическая часть семинара будет включать основные сведения о кинетическом турбидиметрическом методе, приборе для его проведения и программном обеспечении. Целью практической части является выработка основных навыков работы с прибором Pygos Kinetix и программным обеспечением к нему. Практическая часть предполагает проведение полного цикла исследований: от построения стандартной калибровочной кривой до проведения анализа «Мешающие факторы» турбидиметрическим кинетическим методом. Этот семинар готовится совместно с компанией «TechCare Systems», являющейся представителем американской компании «Associates of Cape Cod» - разработчика прибора, программного обеспечения к нему и ЛАЛ-реактива для проведения турбидиметрического метода.

Заявки на участие в двух базовых семинарах можно отправлять в ЛАЛ-Центр

Тел.: (095) 517-40-37, т./ф. 265-32-54

E-mail: [LALNews@Limulustest.ru](mailto:LALNews@Limulustest.ru)

или в Учебный центр Государственного Научного Центра по Антибиотикам

Тел/факс: (095) 111-50-08.

E-mail: [mailto:gmp2002@mail.ru](mailto:mailto:gmp2002@mail.ru)

**Тема семинара: «Использование ЛАЛ-теста для контроля качества растворов для инфузий».**

Семинар предназначен, в основном, для специалистов, занятых в производстве инфузионных растворов. К этой группе препаратов традиционно предъявляются более высокие требования по содержанию бактериальных эндотоксинов. Проверка их может быть сопряжена с известными трудностями, связанными с возможным ингибированием и небольшим значением МДР. На семинаре будут рассматриваться вопросы выбора значения предельного содержания бактериальных эндотоксинов, правила валидации метода, использование ЛАЛ-теста для проведения постадийного контроля, установление норм «тревоги» и «действия» по содержанию бактериальных эндотоксинов. Отработка и оптимизация процедуры проведения рутинных анализов. Планируется проведение практических занятий разными методами – гель-тромб тестом и кинетическим турбидиметрическим тестом.

Если Вас заинтересовали темы специализированных семинаров, просьба сообщить нам по телефонам: (095) 517-40-37, 265-32-54. Мы будем очень рады узнать Ваше мнение, также мы готовы к рассмотрению предложений, интересующих Вас и Ваших коллег.

*Дорогие друзья!*

*Этим номером завершается первый год издания нашего бюллетеня. Мы очень надеемся, что первые четыре номера были интересны для вас. В следующем году мы планируем продолжение издания Бюллетеня.*

*Темой первых двух номеров будет «Валидация метода для лекарственного препарата».*

*В первом номере будут рассмотрены правила проведения предварительных анализов, позволяющих выявить наличие/отсутствие ингибирования реакции гелеобразования со стороны лекарственного препарата. Данный анализ является основанием для выбора степени разведения (концентрации), в которой можно проводить анализ «Мешающие факторы».*

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

*При перепечатке материалов ссылка на бюллетень «ЛАЛ-тест» обязательна.*

*Контактная информация, справки и вопросы:*

*Тел.: (095) 517-40-37, 265-32-54*

*E-mail: LALNews@Limulustest.ru*

**Редакционная коллегия бюллетеня «ЛАЛ-тест»:**

**Ситников А. Г.**

**Неугодова Н.П.**

**Долгова Г.В.**

**Главный редактор: Ситников А.Г.**

Подписано к печати: 25.12.2003 г.

Формат: А4; Бумага: 115 г/м<sup>2</sup>; Печать: Офсет; Объем: 12 стр.; Тираж: 200 экземпляров.

*Бюллетень зарегистрирован в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации № 77-16115 от 11.08.03 г.*

Типография: ООО «Соверо-принт», Москва.