

Колонка редактора

В этом номере мы продолжаем рассматривать вопросы методологии ЛАЛ-теста. Во второй части статьи мы попытаемся провести сравнение основных фармакопейных методов и реактивов, предназначенных для их проведения. Методы можно сравнивать по самым разным параметрам, и смотреть на них хочется с разных ракурсов. Степеней свободы оказывается слишком много. Сравнить приходится реактивы, приборы, программы для обработки результатов, такие специфические характеристики методов как время проведения анализа, диапазоны измерения и т.д. Как все это сравнивать, как решить, что лучше, а что хуже? Можно ли сравнивать одновременно достоинства программ и состав реактивов? И вообще есть ли «плохие» методы, и какой в этом случае «самый лучший»?

За десять лет использования гель-тромб теста накоплено достаточно практического опыта, есть и статистика. К сожалению, ничего подобного нельзя сказать о кинетических анализах. Мы попытались собрать и, по возможности, систематизировать доступные материалы по разным методам, но сравнивать приходится их «паспортные характеристики», которые не всегда необходимы в практике повседневной работы. В статье мы неоднократно будем обращаться к «классикам жанра», таким мэтрам как Томас Новитский (Novitsky T.J.) и Джеймс Купер (Cooper J F). Их статьи, даже если это реклама собственной продукции, неизменно отличает высокий профессионализм и объективность. Наконец, в качестве приложения к статье мы поместили несколько таблиц, которые в нашем представлении можно рассматривать как некие срезы, представляющие информацию под разными углами и суммированную по разным параметрам.

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

Методы проведения анализа.

II. Реактивы, их характеристики, сравнение методов.

Ситников А. Г.

ЛАЛ-реактивы, предназначенные для проведения анализа различными методами.

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

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

Следует обратить внимание на то, что список реактивов не полностью соответствует списку методов. Так, для обоих вариантов гель-тромб теста используется один и тот же реактив. Реактивов, специально предназначенных для проведения турбидиметрического теста по конечной точке, нет. А для каждого варианта проведения хромогенного анализа есть свой ЛАЛ-реактив. Примененный признак систематизации метод/реактив вполне понятен сегодня, хотя исторически развитие методологии шло за развитием реактивов и приборного обеспечения. В первую очередь, конечно реактивов. Классический ЛАЛ-реактив, который получали еще Левин и Банг в середине 60-х годов, использовали для проведения пробирочного анализа, который назвали гель-тромб тест (*gel clot assay*). Позже этот же реактив стали использовать для проведения количественного спектрофотометрического определения эндотоксинов (определение белка по Лоури), но этот метод не прижился.

Возможность постановки анализа на универсальных лабораторных спектрофотометрах (ридерах), позволяющих проводить измерения в течение всего времени инкубирования, привело к появлению кинетического турбидиметрического анализа (*kinetic turbidimetric assay*). В 1977 году появилось первое упоминание о возможности использования хромогенного субстрата для оценки активности ферментной системы. Так появился новый метод - хромогенный тест (*chromogenic assay*), который поначалу был только анализом по конечной точке. Как только появился реактив, позволяющий проводить хромогенный анализ в один этап (за одно инкубирование), сразу возникла и кинетическая разновидность хромогенного теста, изменилась и терминология. Хромогенный анализ стали разделять на два анализа: по конечной точке и кинетический.

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

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

Реактивы для гель-тромб теста отличаются очень большим разнообразием, причем не только по чувствительности, но и по вариантам фасовок от флаконов на 50 определений (5,2 мл) до разовых пробирок на одно определение. Впрочем, эти характеристики, как и способы разведения и хранения реактивов для гель-тромб теста, хорошо известны большинству наших читателей, поэтому мы не будем на них останавливаться подробно. Отметим только, что из всех прочих реактивов они наиболее стабильны при хранении (конечно настолько,

насколько понятие стабильность применимо к белковым препаратам). Стандартные сроки годности лиофилизированного ЛАЛ-реактива составляют 3-5 лет с момента выпуска. Реактив отличается хорошей стабильностью при хранении и транспортировке. После разведения он может храниться сутки при 2-8°C и от 30 до 90 суток в замороженном виде.

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

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

Наиболее заметное отличие реактивов, предназначенных для проведения кинетических анализов, заключается в том, что для них не указывается чувствительность. Чувствительность, точнее диапазон измерения, определяется пользователем при построении калибровочной кривой. Используя один и тот же реактив, можно построить калибровочную кривую для серии стандартов, например 0,01 - 100 ЕЭ/мл или 0,5 - 50 ЕЭ/мл. В первом случае максимальная чувствительность определения (она же чувствительность ЛАЛ-реактива в опыте, λ) будет равна 0,01 ЕЭ/мл, во втором случае она будет равна 0,5 ЕЭ/мл. Время проведения анализа зависит от наименьшей концентрации стандарта эндотоксина, используемой для построения калибровочной кривой. Обычно оно колеблется от 30-35 минут до одного часа, иногда и более.

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

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

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

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

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

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

кинетического анализа - кинетический хромогенный тест. Этот анализ оказался гораздо более удобным, чем анализ по конечной точке. Достаточно сказать, что диапазон измерения у кинетического анализа на несколько порядков шире, чем у анализа по конечной точке.

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

Наверное, любое достоинство имеет свою обратную сторону, в данном случае за стабильность результатов приходится платить относительно коротким сроком хранения разведенного ЛАЛ-реактива для хромогенного анализа (несколько часов при 2-8°C и обычно только две недели после заморозки), поэтому такой реактив поставляется во флаконах по 2,5-3,0 мл, в отличие от обычных флаконов на 5,0 мл для гель-тромб теста и турбидиметрического теста.

Интересно отметить, что ЛАЛ-реактивы, предназначенные для проведения кинетического хромогенного анализа и, в известной степени, методики работы с ними, предельно стандартизованы и мало отличаются у разных производителей. Так, минимальная концентрация эндотоксина,

определяемая с помощью реактива любого производителя, составляет 0,005 ЕЭ/мл. И все они оптимизированы для построения калибровочных кривых от минимальной концентрации 0,005 ЕЭ/мл до максимума, соответствующего концентрации 50 ЕЭ/мл. Оборудование для проведения этого анализа тоже в максимальной степени стандартизовано.

Сравнительная характеристика различных методов.

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

более, что и хромогенный, и турбидиметрический кинетические анализы могут быть проведены на одном и том же оборудовании.

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

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

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

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

Чувствительность методов/рабочие диапазоны измерения разных методов.

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

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

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

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

Возникает вопрос: зачем разводить препарат в 58 000 раз, сколько ошибок можно наделать, готовя такое разведение, и что в этом разведении от препарата останется? Ведь задачей проверки является обеспечение (или контроль) качества препарата и, желательно, с достаточным уровнем безопасности полученного результата. В этом смысле вполне приемлемым может быть

результат, свидетельствующий, что содержание эндотоксина в препарате равно или меньше 5 ЕЭ/мл или даже 0,5 ЕЭ/мл (определение уровня безопасности - задача того, кто планирует анализ). Эти значения регистрируются любым методом, при условии, что определению не мешает ингибирование. Поэтому высокая чувствительность кинетических анализов необходима далеко не всегда, в этих анализах при построении калибровочных кривых вполне можно ограничиться минимальной концентрацией 0,01-0,05 ЕЭ/мл, что сопоставимо с чувствительностью ЛАЛ-реактива для гель-тромб теста.

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

В кинетических анализах понятие *определяемой в опыте концентрации эндотоксинов* выходит за рамки привычных для гель-тромб теста определений. В гель-тромб тесте оно соответствует чувствительности метода, точнее, чувствительности ЛАЛ-реактива (λ). В кинетических анализах за λ принимается *наименьшая концентрация КСЭ, используемая для построения калибровочной кривой*. Есть еще и наибольшая концентрация КСЭ и, соответственно, *диапазон концентраций*, в котором возможно определение содержания эндотоксинов. В кинетических анализах этот диапазон потенциально очень широк. Согласно инструкциям по применению различные ЛАЛ-реактивы для кинетических анализов позволяют получать результаты в диапазонах 0,01 - 100 ЕЭ/мл, 0,005 - 50 ЕЭ/мл и даже 0,001 - 100 ЕЭ/мл. Таким образом, разница между минимальной и максимальной концентрациями может быть в 10 000 или 100 000 раз. Это очень много и заманчиво, так, если бы приведенный выше в качестве примера препарат Диклофенак совсем не ингибировал реакцию, можно было бы, проверив его исходный раствор, принять решение по качеству серии, причем по совершенно конкретному, количественно определенному значению содержания эндотоксинов в препарате. Однако с практической точки зрения калибровочные кривые с таким широким диапазоном строить нецелесообразно, поскольку снижается точность определения и значительно увеличивается время реакции. Лучше, опираясь на опыт предыдущих анализов или на собственный здравый смысл, выбрать

диапазон измерения более узкий, но обеспечивающий получение приемлемых и информативных результатов. Например, можно было бы проверить препарат в диапазоне концентраций 0,1 - 10 ЕЭ/мл. В этом случае анализ занимает меньше времени, и снижается расход реактивов. Если реальное содержание эндотоксинов не попадает в выбранный диапазон, выводы будут аналогичны выводам, обычным для качественного гель-тромб теста: больше или меньше. Но в случае кинетического анализа «меньше» значит меньше минимальной концентрации КСЭ, а «больше» значит больше максимальной концентрации КСЭ, которые были использованы для построения калибровочной кривой.

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

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

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

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

Точность определения концентрации эндотоксинов.

Количественные результаты, полученные с помощью разных методов, как правило, сопоставимы. Хотя результаты проверки одного и того же препарата разными методами могут заметно отличаться друг от друга. Например, при проверке получены следующие значения концентрации эндотоксина:

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

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

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

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

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

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

Ингибирование реакции.

Ингибирование реакции со стороны испытуемого препарата - это проблема, возникающая довольно часто. Так, для приведенного в качестве примера раствора Диклофенака д/и ингибирование в гель-тромб тесте может быть снято в разведениях в 100 - 200 раз, а в определенных ситуациях и в больших. Часто именно ингибирование не дает возможности определить концентрацию эндотоксинов. Для Диклофенака, проверенного в гель-тромб тесте, стандартным ответом является менее 3,0 ЕЭ/мл или

6,0 ЕЭ/мл, а насколько «менее» неизвестно по причине ингибирования.

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

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

Степень разведения, необходимая для преодоления ингибирования.

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

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

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

Значение МДР в зависимости от чувствительности метода.

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

При расчете МДР использованы значения максимально возможной чувствительности по каждому из методов. Следует помнить, что ингибирование в кинетическом турбидиметрическом методе во многом зависит от оборудования и техники эксперимента. В приведенных выше таблицах использованы данные по модификации турбидиметрического теста, проводимого в пробирках. В таком анализе отношение объемов испытуемого препарата и ЛАЛ-реактива составляет 4:1. Относительно меньшая концентрация ЛАЛ-реактива в реакционной смеси оказывается причиной

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

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

Еще один пример сравнительной оценки одного и того же препарата, проверенного гель-тромб тестом и двумя кинетическими анализами, приведен в Таблице 1 Приложения.

Литература.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Приложения

Таблица 1. Параллельный анализ испытуемого препарата разными методами (цит. по Cooper J.F. 1998).

Испытуемый препарат: NaCl, субстанция;

Содержание бактериальных эндотоксинов – не более 5 ЕЭ/г;

Исходный раствор 10% (0,1 г/мл), содержание БЭ для исходного раствора – не более 0,5 ЕЭ/мл.

Метод	Чувствительность метода (λ), ЕЭ/мл	МДР	Ингибирование снимается в разведении исходного р-ра	Содержание бактериальных эндотоксинов, ЕЭ/мл
<i>Гель-тромб тест, Метод В</i>	0,03 ЕЭ/мл	16	1/4	<0,12
<i>Кинетический турбидиметрический тест, Метод С</i>	0,005 ЕЭ/мл	100	1/20	<0,10
<i>Кинетический хромогенный тест, Метод D</i>	0,005 ЕЭ/мл	100	1/20	<0,10

Таблица 2. ЛАЛ-реактивы, выпускаемые компанией Charles River Endosafe. Торговые названия реактивов и методы, для которых они предназначены.

Название реактива	Гель-тромб тест		Турбидиметрический тест		Хромогенный тест	
	Метод А	Метод В	Метод С	Метод F	Метод D	Метод E
<i>Endosafe</i>	да	да	-	-	-	-
<i>Endosafe KTA</i>	да	да	да	да*	-	-
<i>Endosafe KTA 2</i>	-	-	да	да*	-	-
<i>Endosafe Endochrome</i>	-	-	-	-	-	да
<i>Endosafe Endochrome-K</i>	-	-	-	-	да	да*

Примечания:

* Возможно использование реактива для проведения указанного анализа.

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

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

Бюллетень «ЛАЛ-тест» выходит с периодичностью 4 раза в год.

Бюллетень распространяется бесплатно. Для оформления подписки просим отправлять заявки:

ООО «ЛАЛ-Центр»

117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3а, офис Б-421.

Тел.: (495) 517-40-37, факс: (495) 223-07-29.

E-mail: LALNews@Limulustest.ru

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

Главный редактор: Ситников А.Г.

Редакционная коллегия: Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Чиркова М.Н., Демидова В.В.

Подписано к печати: 25.09.2006 г.; Формат: А4; Бумага: супербелый лен 90 г/м²; Печать: Офсет;

Объем: 8 стр.; Тираж: 300 экземпляров. Отпечатано в типографии ООО «Формула Цвета», Москва.



ЛАЛ-ЦЕНТР

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