

Колонка редактора

В этом номере мы завершаем цикл статей, посвященных различным методам проведения анализа. В заключительной статье рассматриваются приборы и программное обеспечение, которые используются для проведения фотометрических анализов.

Тема методологии ЛАЛ-теста оказалась настолько интересной и обширной, что мы вышли за формат одного номера. Надеемся, что время потрачено не зря, и это только начало серьезной работы по изучению и освоению новых методов. Не исключено, что параллельно эта работа приведет и к лучшему пониманию свойств и характеристик «старых» методов проведения анализа.

Мы рады, что наши коллеги откликнулись на предложение принять участие в обсуждении методов проведения анализа, и с удовольствием представляем вашему вниманию статью специалистов Гематологического Научного Центра РАМН, имеющих многолетний опыт использования кинетического турбидиметрического теста.

Наконец, в разделе новостей мы рассказываем о нашем партнере - компании Charles River Endosafe и о наших планах по развитию и совершенствованию системы обращения ЛАЛ-реактива.

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

Методы проведения анализа.

III. Оборудование, необходимое для проведения инструментальных анализов.

Ситников А. Г.

Приборы

Для проведения инструментальных анализов обычно используются не одиночные приборы, а целый измерительный комплекс. Такой комплекс может быть достаточно сложным, особенно это относится к кинетическим анализам. Основной его частью является спектрофотометр (ридер), позволяющий инкубировать реакционные смеси и считывать результаты. Использоваться могут как приборы, позволяющие проводить анализ в стеклянных пробирках, так и ридеры, предназначенные для работы с микропланшетами.

К первой группе относятся узкоспециализированные приборы, созданные практически под одну задачу, - проведение ЛАЛ-теста, причем в одной его модификации - кинетического турбидиметрического анализа. В качестве примера можно привести приборы **LAL-5000** и **PyrosKinetix** (Associates of Cape Code). Внешне они напоминают твердотельные термоблоки, только большего размера. Кстати, они могут быть использованы и как термоблок для проведения гель-тромб теста. Прибор имеет 32 - 96 лунок для пробирок, соответственно, количество проводимых одновременно анализов может быть достаточно большим. После помещения пробирок в прибор начинается их инкубирование и одновременно считывание результатов. Данные передаются на компьютер и обрабатываются специальной программой. Именно для этого прибора создан ЛАЛ-реактив **Pyrotell-T** и специальное программное обеспечение **PyrosKinetix** (Associates of Cape Code).

Считается, что наибольшей чувствительности определения (0,001 ЕЭ/мл) можно добиться именно с помощью этой системы (приборы LAL-5000 или PyrosKinetix, стеклянные пробирки, реактив Pyrotell-T, ПО PyrosKinetix). В определенном смысле такую систему можно было бы назвать идеальной, если бы не общий недостаток всех идеальных систем - слишком жесткая привязка к одному единственному методу и реактиву.

Альтернативным вариантом являются ридеры для микропланшет. Это универсальные приборы, которые могут быть использованы для проведения различных анализов и, в том числе ЛАЛ-теста. Обычно, это ридеры **Bio-Tek** или **Tecan Sunrise**. Системы проведения анализов, построенные на основе ридеров для микропланшет, как правило, оказываются более гибкими и универсальными. Важным является то, что эти приборы дают возможность проводить анализ с помощью четырех различных методов:

- Метод С. Кинетический турбидиметрический тест;
- Метод D. Кинетический хромогенный тест;
- Метод E. Хромогенный тест по конечной точке;
- Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.

Ридер **Bio-Tek ELx808IU** является базовой моделью, на которую ориентированы все производители ЛАЛ-реактивов, и следовательно, на этом приборе можно проводить не только разные анализы, но и использовать реактивы разных производителей.



Bio-Tek ELx808IU

Программное обеспечение

К числу программ, созданных специально для проведения различных инструментальных методов, можно отнести следующие программы:

- **WinKQCL (Cambrex Bio Science);**
- **Pyrosoft-11 (Associates of Cape Cod);**
- **PyrosKinetix (Associates of Cape Cod);**
- **EndoScan-V (Charles River Endosafe);**
- **Biotrend (Charles River Endosafe).**

Программа **PyrosKinetix** упоминалась выше, она предназначена только для проведения анализа турбидиметрическим кинетическим методом. Остальные программы в той или иной степени универсальны. Они позволяют проводить разные анализы, а некоторые и работать с реактивами разных производителей. Эти пакеты программ позволяют управлять разными приборами,

причем любая из них работает с упомянутым выше ридером **Bio-Tek ELx808IU**.

Архитектура программ разных производителей различна. Это может быть программа, сочетающая в себе максимум функций: сбор и обработка результатов, статистическая обработка, хранение больших архивов данных. Есть программы, представляющие собой отдельные модули, которые могут работать как самостоятельно, так и вместе. В первом случае пользователь получает программный продукт «на все случаи жизни», во втором он может наращивать функциональные возможности тогда, когда эти «случаи» возникают. Несмотря на разницу подходов, принципиальных отличий у программ нет, стоимость одной большой программы и программы, составленной из нескольких самостоятельных модулей, тоже примерно одинакова.

Надо признать, что первоначальное освоение программ может вызвать трудности. К тому же, все они, к сожалению, англоязычны, и локализованных версий ждать не приходится. Зато после освоения работа доставляет удовольствие. Программы используют привычный оконный интерфейс, большинство команд меню (во всяком случае, пиктограммы на кнопках) известны всем, кто работает на компьютере. Такие функции, как использование шаблонов, автоматическое создание повторностей, автоматическое создание положительного контроля дают возможность за считанные минуты создать карту микропланшеты. В процессе измерения программа позволяет просматривать изменения, происходящие в каждой лунке. Ход реакции можно наблюдать в реальном времени и при наличии определенного опыта можно понять, какими будут результаты еще до конца анализа.

После завершения измерений программа автоматически обчисляет результаты, строит калибровочную кривую, определяет концентрацию эндотоксинов в испытуемых образцах и анализирует достоверность результатов по нескольким критериям. Отчет об опыте (протокол) генерируется автоматически, он может включать различные параметры, некоторые из них определяются пользователем. Наконец, этот отчет можно не только распечатать, но и послать по электронной почте или по факсу. Эти операции программа может проделать самостоятельно, главное, чтобы ПК был подключен к сети или телефонной линии.

Еще одна любопытная характеристика программ. Все они соответствуют современным требованиям FDA, предъявляемым к программному обеспечению (CFR Part 21), цель которых: «... определить критерии, по которым FDA может считать

электронные данные эквивалентом печатной документации, а электронные подписи – эквивалентом традиционной подписи на бумаге». Эти комплексные правила в частности исключают возможность изменения результатов опыта, внесения исправлений, несанкционированное обращение к программе и т.д.

Заключение

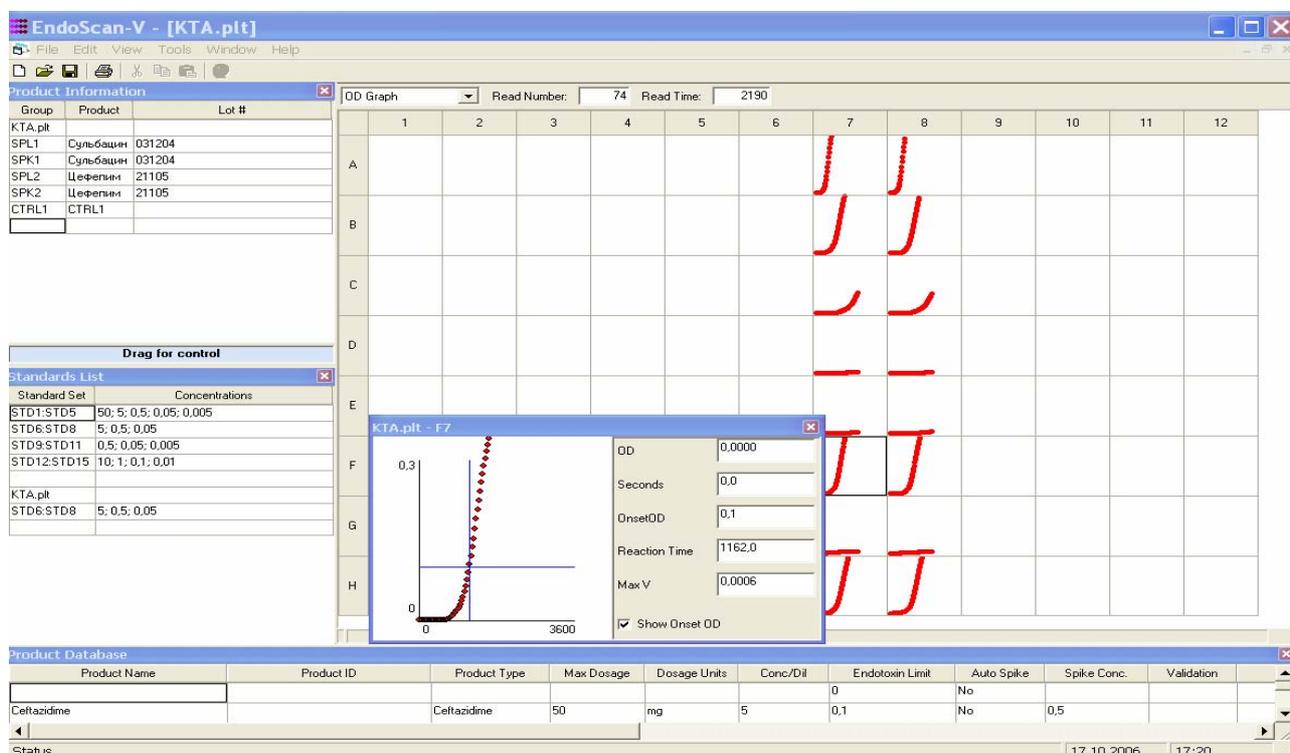
Выше уже не раз упоминалось, что из шести описанных в фармакопеях методов наиболее популярными и используемыми являются три метода: гель-тромб тест и оба варианта кинетических анализов. Приводя характеристики методов и сравнивая их между собой, мы старались не делить методы на плохие и хорошие. Все зависит от конкретной ситуации и задач, которые необходимо решать, т.е. от целевого назначения анализа.

Очевидно, что первоочередное назначение фармакопейных методов анализа – контроль качества готовой продукции. ЛАЛ-тест используется и для решения задач обеспечения качества производства, что включает входной контроль сырья, субстанций, полупродуктов, контроль технологических процессов, в том числе и на соответствие установленным для этих процессов уровням «тревоги» и «действия» и т.д.

В случае контроля качества готового лекарственного средства основным

требованием, предъявляемым к методу контроля, является получение достоверного результата о соответствии ЛС установленным нормам качества. При этом не важно, качественный это результат или количественный. Такой результат может быть получен с помощью любого из рассмотренных методов проведения анализа. Поэтому в большинстве случаев возможностей гель-тромб теста оказывается вполне достаточно для проведения контрольных анализов.

При решении круга вопросов, относящихся к обеспечению качества производства ЛС, предпочтительнее использовать количественные результаты. Получить такие результаты можно и с помощью гель-тромб теста, но все же его возможности по точному определению концентрации эндотоксинов весьма ограничены. Точное определение содержания эндотоксинов на разных стадиях производства позволяет перейти в буквальном смысле к прогнозированию качества. Так, если известна концентрация эндотоксинов в субстанции и в воде, используемых для приготовления лекарственного препарата, если процедуры обработки оборудования и технологические процессы валидированы и контролируются в реальном времени, можно с большой степенью уверенности определить, какова будет концентрация эндотоксинов в готовой форме.



Рабочий интерфейс программы EndoScan-V.

Из сказанного можно было бы сделать вывод, что для контрольных лабораторий основным методом является гель-тромб тест. А при производстве лекарственных средств более целесообразно использование инструментальных анализов. Это в принципе верно, но при большом количестве анализов, вне зависимости от их назначения, неизбежно встанет вопрос о переходе к инструментальным методам анализа. Если же анализы проводятся редко, то наиболее рациональным решением будет, конечно, гель-тромб тест.

Следует признать, что инструментальные методы представляют собой комплексное и универсальное решение по сравнению с гель-тромб тестом. Исключительно полезными оказываются и прикладные компьютерные программы, предназначенные для проведения анализа и обработки результатов. Они позволяют хранить, обрабатывать и сравнивать между собой данные анализов, проведенных в разное время. Еще одно достоинство инструментальных методов заключается в том, что в них легко идентифицируются ошибки, связанные с «человеческим фактором», т.е. ошибки аналитика, допущенные на стадиях подготовки к опыту. Переход на эти методы наиболее рационален для крупных производств и крупных контрольных

лабораторий, для лабораторий, проверяющих большое количество импортных препаратов, в НД которых часто включены кинетические методы контроля содержания эндотоксинов. В этой связи надо упомянуть, что есть целые группы препаратов, которые проверяются исключительно инструментальными методами, например, практически все инсулины проверяются хромогенным кинетическим методом.

К достоинствам гель-тромб теста можно отнести то, что он относительно прост в освоении, для его проведения требуется минимум пространства и оборудования. Это лучший вариант для лабораторий, которые проводят один - два анализа в неделю. В тоже время, гель-тромб тест дает возможность проверять препараты, образующие суспензии, или препараты, окраска которых не позволяет проводить фотометрические анализы.

Мы понимаем, что обзор методов получился далеко не полным. Действительно, об особенностях каждого метода можно написать не меньше, чем о свойствах гель-тромб теста. Понятно, что впереди еще много работы. Многое предстоит понять и освоить. Тем более, что на подходе уже совершенно новые варианты проведения ЛАЛ-теста, новые реактивы и оборудование.

Общая сопоставительная характеристика трех основных методов проведения анализа.

	Гель-тромб тест, Методы А и В	Кинетический турбидиметрический тест, Метод С	Кинетический хромогенный тест, Метод D
<i>Результаты</i>	Качественные /количественные	Количественные	Количественные
<i>Точность определения</i>	50-200%	+/- 25(50)%	+/- 25(50)%
<i>Расходные материалы</i>	Пробирки	Микропланшеты или пробирки	Микропланшеты
<i>Максимальное количество образцов в одном анализе</i>	Ограничено размерами бани или термоблока, обычно не более 3-4 образцов	Ограничено размерами микропланшета, до 20 образцов	Ограничено размерами микропланшета, до 20 образцов
<i>Чувствительность</i>	0,015-0,25 ЕЭ/мл	0,001-100 ЕЭ/мл	0,005-50 ЕЭ/мл
<i>Время анализа</i>	60 мин	30- 60 мин	30 - 60 мин
<i>Специализированное оборудование/длина волны</i>	Нет	Ридер для микропланшет или для пробирок / 340 нм	Ридер для микропланшет / 405 нм
<i>Программное обеспечение</i>	Нет	Да	Да

«Применение кинетического теста в системе внутрипроизводственного контроля».

Сорокина Т.С., Ажигирова М.А.,
ГУ Гематологический Научный Центр РАМН,
г. Москва.

В статье рассмотрен вариант использования количественного метода определения бактериальных эндотоксинов (LAL-тест) как составляющей части всего внутрипроизводственного контроля при получении препаратов плазмы крови на пилотном производстве, функционирующем на базе ГУ Гематологический Научный Центр РАМН. Показаны преимущества количественного инструментального метода.

В настоящее время в ГУ Гематологический научный центр РАМН функционирует Отдел Экспериментальной Производственной Трансфузиологии (ОЭПТ), который представляет собой пилотное производство препаратов плазмы крови человека. Производство имеет лицензию № 64/0180-Л/03 от 16 апреля 2003 г. и выпускает в качестве готовой продукции антигемофильные препараты: «Агемфил А, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 250 МЕ», «Агемфил В, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 250 МЕ», а также субстанцию «Плазма после удаления факторов VIII, IX для фракционирования».

Система контроля качества в ОЭПТ, организованная в соответствии с современными требованиями к

функционированию фармацевтических производств, представляет собой комплекс взаимосвязанных разделов и осуществляется на трех уровнях:

- контроль качества исходного сырья, используемых реактивов и воды, воздушной среды, а также состояния помещений, оборудования и персонала;
- внутрипроизводственный контроль за проведением процесса получения продукции;
- контроль готовой продукции.

В основе пилотного производства лежат хроматографические методы, при которых бактериальные эндотоксины могут являться частью системы разделения и способны катастрофически загрязнить целевой продукт. LAL- тест является одним из наиболее оптимальных методов, позволяющих критично оценить отдельные стадии производственного процесса. Причем для обеспечения качества на всех этапах производства используется не качественный, а количественный метод определения эндотоксинов.

Кинетический тест помутнения проводится посредством использования специально разработанного прибора LAL-5000. Данный прибор измеряет реакцию между реактивом LAL и эндотоксином путем оптического наблюдения развития помутнения. Прибор позволяет обсчитывать 32 образца и управляется с помощью персонального компьютера. Все получаемые цифровые, графические, табличные данные сохраняются в электронном формате, что позволяет манипулировать ими в любой момент.

В таблице 1 представлены наиболее полные характеристики указанного прибора, а также набор реактивов и материалов.

Таблица 1.

Приборы и реактивы, используемые при проведении LAL-теста.

Оборудование	Реактивы
1. Ламинарный шкаф Jouan MSC 12. 2. Прибор LAL-5000 с программным обеспечением «Pyros for Windows». 3. Персональный компьютер, операционная система Windows 98. 4. Встряхиватель «vortex mixer». 5. Дозаторы автоматические «Eppendorf». 6. Стерильные и апиrogenные наконечники «Eppendorf». 7. Стерильные и апиrogenные пробирки «ACILA».	8. LAL-реактив (Pyrotell-T Turbidimetric Formulation). 9. Контрольный стандарт эндотоксина (Control Standart Endotoxin). 10. LAL-вода (LAL Reagent Water). Фирма производитель: Associates of Cape Cod, Inc. (США).

Указанный количественный тест выступает в виде части внутрипроизводственного контроля чистоты многих объектов:

1. Контроль качества воды, используемой на всех стадиях производства. Отбор проб производится непосредственно перед проведением тех или иных технологических операций в разных точках. Тест позволяет быстро и объективно оценить: готовность системы водоподготовки к постоянному эксплуатированию в течение всего технологического процесса, правильность работы операторов, обслуживающих систему и отбирающих пробы.
2. Контроль используемых емкостей. В день приготовления буферных растворов берутся смывы с поверхностей используемых емкостей. При получении отрицательного результата емкости перебиваются, процесс начинается только при повторном контроле.
3. Контроль качества приготовленных буферных растворов. Буфера используются в процессе хроматографического фракционирования, и от их качества напрямую зависит качество целевой фракции (концентрата получаемого белка).
4. Контроль качества получаемого полупродукта после проведения стадий стерилизующей фильтрации и розлива во флаконы. Позволяет оценить качество практически готовой продукции перед проведением стадии лиофилизации.

Таким образом, выявив в процессе постоянного мониторинга критические пределы по содержанию бактериальных эндотоксинов, устраняется возможность получения готовой продукции, несоответствующей показателю «Пирогенность». Причем контроль качества ГЛФ по показателю «Пирогенность» проводится посредством проведения теста «Пирогенность» на животных, так как получаемые препараты сложны и специфичны по своим свойствам, и только таким образом, возможно получить доказательство полной безопасности лекарственного средства для здоровья пациента.

Процедура выполнения метода LAL-тест проводится обученным оператором согласно утвержденной СОП «Определение уровня содержания бактериальных эндотоксинов

турбидиметрическим методом», что также позволяет избежать случайных ошибок и снижает значимость «человеческого» фактора.

Наиболее критические точки, выявляющиеся при применении данной методики в системе внутрипроизводственного контроля, отражены в таблице 2.

Таблица 2.

Критические аспекты при проведении контроля турбидиметрическим методом.

Проблема	Пути решения
Правильность отбора проб (<i>возможность контаминации извне</i>).	Четкое выполнение действий в соответствии с утвержденной СОП. Фиксированные точки отбора.
Правильность приготовления образцов для исследования (<i>точность дозирования</i>).	Калибровка автоматических дозаторов перед каждым проведением контроля.
Правильность подготовки пробирок (<i>осуществление депирогенизации</i>).	Постановка негативного контроля при проведении каждого теста.

О преимуществах использования количественного метода упоминалось во многих публикациях, однако на основании полученного опыта хотелось бы упомянуть следующие:

- Количественная оценка состояния воды, используемой на производстве;
- Количественная оценка состояния производственного оборудования и окружающей среды;
- Количественная оценка состояния рабочих буферных растворов;
- Возможность быстрого получения количественного результата;
- Возможность прогнозирования конечного результата производственного процесса;
- Возможность снижения риска выпуска пирогенной продукции.

Новости ЛАЛ-Центра

Чиркова М.Н.

Как известно многим нашим читателям, между нашей компанией и компанией [Charles River Endosafe, Division of Charles River Laboratories Inc, США](#) подписано соглашение о сотрудничестве. Это соглашение означает, что [ЛАЛ-ЦЕНТР](#), начиная с 2006 года, стал официальным представителем в России и СНГ всего спектра производимых этой компанией реактивов, вспомогательных материалов и оборудования для проведения ЛАЛ-теста.

Реактивы компании [Charles River Endosafe](#) хорошо известны многим нашим коллегам. Раньше они были представлены компанией ТАНДРА, которая за несколько лет работы завоевала авторитет среди потребителей. Много было сделано для популяризации метода и реактива ENDOSAFE. В активе этой компании числятся хорошее информационное обеспечение продаж реактивов, первые переводы инструкций и интересные собственные методические рекомендации по проведению анализа.

Три года назад ТАНДРА прекратила продажи реактивов, и до недавнего времени реактивы ENDOSAFE отсутствовали на нашем рынке. В то же время эта компания - одна из трех китов, на которых держится практически весь оборот ЛАЛ-реактива в мире. Компания ENDOSAFE была основана в 1987 году, ее основатель доктор Джеймс Купер (Cooper J.F) - человек, стоявший у истоков ЛАЛ-теста и приложивший много усилий для того, чтобы сделать его официальным методом. В 1994 году компания Endosafe вошла в состав Charles River Laboratories, сохранив название торговой марки ЛАЛ-реактива - ENDOSAFE®. Компания располагает производственным комплексом в Чарльстоне (Charleston, SC), который сертифицирован FDA на соответствие правилам GMP. Все реактивы, предназначенные для проведения официальных фармакопейных анализов, лицензированы FDA. В активе компании не только реактивы высокого качества и стабильности, но и интереснейшие инновационные разработки. Это и универсальные реактивы для проведения анализа разными методами, программное обеспечение для сбора и анализа данных, полностью автоматизированные системы для проведения ЛАЛ-теста. Одна из последних разработок этой компании - уникальные миниатюрные приборы для проведения анализа Endosafe® -PTS, и многое другое. В одной короткой статье охватить весь спектр продукции просто невозможно.

Союз с такой известной и серьезной компанией, безусловно, очень важен для нас.

Он дает возможность обмениваться информацией с одними из лучших специалистов в области методологии ЛАЛ-теста, быть в курсе всего, что появляется в этой области. Не менее важны экономическая составляющая этого соглашения и прямые контакты с непосредственным производителем реактива. Все это и ко многому обязывает. С самого начала нашей дистрибьюторской деятельности мы подготовили обширную программу мероприятий, основными задачами которой являются:

- Максимально полная информация о характеристиках реактивов, материалов и оборудования;
- Создание полноценной системы обращения реактивов и мониторинга их качества;
- Упрощение системы поставок реактивов;
- Информационная поддержка поставляемых реактивов и оборудования.

Кое-что из запланированного уже сделано, что-то находится в стадии подготовки и доработки, вносятся коррективы и в саму программу.

Подготовлены полные переводы инструкций к реактивам для геля-тромб теста, которые по правилам должны находиться в каждой упаковке с реактивом, даже если это один-единственный флакон. Каждую пару серий ЛАЛ/КСЭ сопровождает не только англоязычный Сертификат Соответствия, но и полный русский перевод.

В стадии завершения переводы инструкций для реактивов, предназначенных для кинетических анализов, и объемное Руководство Пользователя программы Endoscan-V.

Подготовлены новые проекты стандартных операционных процедур (СОПов) на типовые анализы, которые далее могут быть включены в общую систему мониторинга качества реактивов.

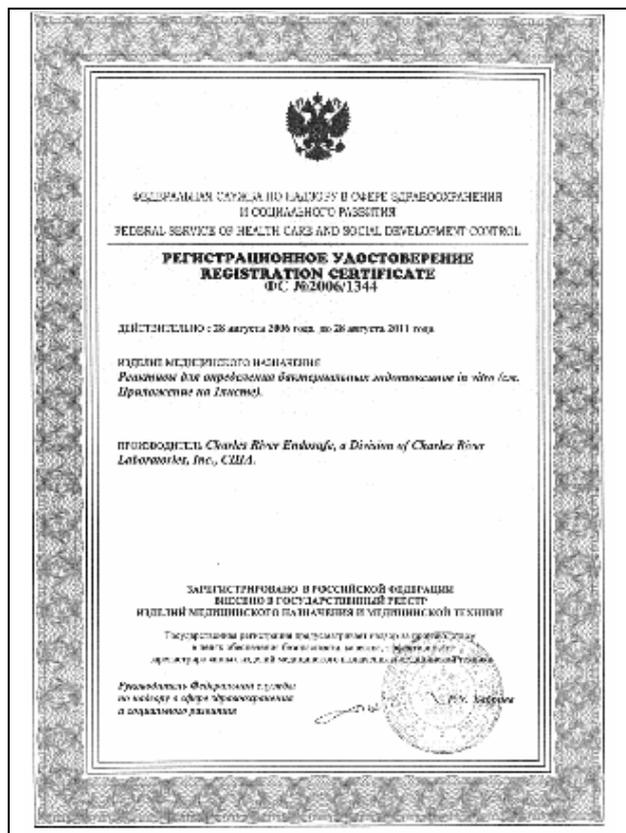
Кардинальные изменения претерпел и прайс-лист: изменения затронули не только цены, изменился и ассортимент предложения, в котором теперь представлены реактивы для всех фармакопейных анализов и в самых различных фасовках и упаковках.

Завершена регистрация реактивов в ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЕ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РУ ФС № 2006/1344 от 28 августа 2006 года. Ранее реактив был зарегистрирован в МЗ РФ под номером №99/113, срок регистрации истек в 2004 году. Новый документ принципиально отличается от предыдущего: впервые зарегистрированы

реактивы для ВСЕХ методов проведения анализа, от всем известного гель-тромб теста до кинетических турбидиметрического и хромогенного тестов. Это обстоятельство является особенно важным для всех работающих с ЛАЛ-тестом, поскольку теперь нет никаких формальных ограничений по выбору метода и реактива, с помощью которого он будет проводиться.

Со следующего номера нашего бюллетеня мы открываем новую рубрику, рабочее название которой «Реактивы и материалы ENDOSAFE». В ней мы будем давать подробную информацию о различных реактивах, вспомогательных материалах, оборудовании, в том числе и по результатам собственного опыта их использования.

Мы понимаем, что все это только первые шаги, и впереди нас ждет много работы. Надеемся, что ее результаты будут полезны всем, кто работает с методом. Если у вас, наших читателей, возникнут какие-либо пожелания или вопросы, пожалуйста, свяжитесь с нами, контактная информация указана в выходных данных издания.



«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., Тутнова А.Д.

Подписано к печати: 20.10.2006 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