



Периодический бюллетень для специалистов, работающих в области фармации, медицины и биологии

Nº3 (24) 2018 г



ТЕМЫ НОМЕРА

В этом номере мы продолжаем разбирать современные требования к валидации ЛАЛ-теста. В Европейскую фармакопею восьмого издания включена статья 5.1.10 «Рекомендации по проведению испытаний на бактериальные эндотоксины». Мы приведём общий обзор этой статьи, пытаясь сделать акцент на наиболее важные ее положения, касающиеся правил проведения валидации метода.

Рекомендации по проведению испытаний на бактериальные эндотоксины Европейской фармакопеи

Ситников А.Г.

Статья «Рекомендации по проведению испытания на бактериальные эндотоксины» (5.1.10. Guidelines for using the test for bacterial endotoxins) появилась в Европейской фармакопее в середине 90х годов, она была расположена сразу за статьей «Бактериальные эндотоксины» (2.6.14. Bacterial endotoxins) и позиционировалась как необязательное приложение к этой статье. В Европейской фармакопее восьмого издания этот текст стал самостоятельной статьей под номером 5.1.10.

Надо сказать, что серьезных изменений в разных редакциях Европейской фармакопеи эта статья не претерпевала. Статья состоит из 14 тематиче-

ских глав или разделов. Далее в тексте выдержки из этой статьи статьи И «Бактериальные эндотоксины» Европейской Фармакопеи будут приводиться курсивом, комментарии идут обычным шрифтом. Текст приводится по русскому переводу Европейской Фармакопеи 8.0.



Раздел 1. Введение. Этот раздел представляет собой краткий конспект всего текста рекомендаций. Интерес в нем представляет четко сформулированное отношение к эндотоксинам, как к основным и наиболее значимым пирогенам:

«Несмотря на наличие незначительного количества пирогенных веществ с другим строением, заключение обычно основано на предположении, что отсутствие бактериальных эндотоксинов в препарате предполагает отсутствие пирогенных компонентов, если присутствие пирогенных веществ, отличных от эндотоксинов, можно исключить».

Это важный момент, ЛАЛ-тест измеряет не пирогенность, он позволяет обнаружить эндотоксины грамотрицательных бактерий. В приведенном абзаце подчеркивается, что основной причиной пирогенной реакции как раз и являются эндотоксины грамотрицательных бактерий.

Раздел 2. Метод. Раздел во многом повторяет общие положения фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины» в части пороговой пирогенной дозы эндотоксина в зависимости от пути введения, правил расчета предельного содержания бактериальных эндотоксинов и правил расчета значения МДР. На этих положениях останавливаться не очень интересно, поскольку они и так хорошо известны и приведены в общей фармакопейной статье. Можно обратить внимание на несколько интересных установок.

В самом начале приводится краткое описание сути реакции на примере гель-тромб теста. Относительно других методов говорится следующее:

«Количественные методы, описанные как методы C, D, E и F, были разработаны позже: эти методы требуют приборного оснащения, однако их проще автоматизировать для регулярного исследования большого числа образцов одного препарата».

Действительно, основное достоинство кинетических методов - это именно возможность автоматизации процесса проверки и снижение рисков, связанных с человеческим фактором. Работа на приборе значительно упрощает всю процедуру проведения анализа, дает возможность проверять большое количество образцов одновременно. Так на стандартном 96-луночном планшете одномоментно можно проверить 20 разных испытуемых образцов. При этом подготовка к проведению анализа не представляет особых сложностей, а инкубирование и считывание результатов проводится в автоматическом режиме.

В тоже время приведенная в этом разделе установка, касающаяся расходных материалов, вызывает некоторое недоумение:

«Эндотоксины могут сорбироваться на поверхности пробирок и пипеток, изготовленных из определенных материалов. Следовательно, используемые материалы должны проверяться. Новые серии пробирок или пипеток могут иметь несколько разный состав, и поэтому рекомендуется повторять такие испытания в начале использования новых серий расходных материалов».

Если буквально следовать этой рекомендации, то каждую новую партию пипеток или наконечников к дозаторам и пробирок надо сначала проверить. Представляется, что такое требование является излишним. Вполне можно ограничиться оценкой приемлемости материала на уровне производитель/каталожный номер.

В этом же разделе приведены правила трактовки результатов качественного гель-тромб теста. В разделе сначала постулируется основное назначение анализа:

«...для соответствия Фармакопеи и при повседневном контроле качества главный вопрос превышает ли эта концентрация допустимый предел или нет».

Далее идет объяснение, как надо интерпретировать результаты качественного гель-тромб теста:

«Если концентрация эндотоксина в препарате точно соответствует предельному значению, происходит образование геля, как и в случае, когда концентрация эндотоксина намного выше, и препарат не выдерживает испытание, потому что принцип испытания «все или ничего» делает невозможным установление различий между концентрацией, точно соответствующей предельному содержанию эндотоксинов, и более высокой концентрацией. Только в случае отсутствия гельтромба аналитик может сделать заключение о

том, что концентрация эндотоксина ниже предельной концентрации».

Собственно, это ответ на вопрос: если в ФСП написано, например, предельное содержание эндотоксинов не более 10 ЕЭ/мл, а в МДР получился плюс, можно считать, что это ровно 10 ЕЭ/мл? Тогда препарат можно было бы считать пригодным. Но в качественном гель-тромб тесте точную цифру получить нельзя. Гель-тромб тест дает только ответ: да/нет. Поэтому положительная реакция для препарата в разведении, равном в МДР, трактуется всегда как больше, чем нужно, и препарат бракуется.

В этом разделе приводятся правила расчета МДР и даются рекомендации о том, как использовать полученное значение и какое значение разведения можно считать предпочтительным:

«Если значение максимально допустимого разведения не является целым числом, для повседневного использования может использоваться подходящее целое число, меньшее, чем МДР, (которое означает приготовление раствора препарата, менее разведенного чем МДР)».

Далее эта мысль развивается и появляется рекомендация о желательности проверки в 1/2 МДР. В качестве примера приводится препарат, МДР которого составляет 41,67.

«Для проведения испытаний этого продукта может быть допустимым развести 1 мл испытуемого раствора до 20 мл (МДР/2 округленный до следующего нижнего целого числа)».

Речь идет о проверке в разведении 1/20, т.е. округленно вдвое меньшем значении разведения, чем расчетное значение МДР.

«Однако, если результат испытания положительный, аналитик должен развести 1 мл до 41, 67 мл и повторить испытание. Разведение до 41,67 мл также необходимо, если испытание выполняется с целью урегулирования спорного вопроса».

Это, пожалуй, единственное упоминание в нормативной документации о предпочтительности проверки в 1/2 МДР. В Рекомендациях речь скорее всего идет о проверке препарата в независимой контрольной лаборатории. Там стоит задача убедиться в том, что серия, вышедшая в обращение, действительно чистая. Проверка в 1/2 МДР гарантирует, что «минус» в опыте, это точно менее предельного содержания, даже с учетом возможной двукратной ошибки опыта.

Раздел 3. Стандартный материал. В этом разделе речь идет о контрольных препаратах эндотоксина — Международном стандарте и Контрольных стандартах эндотоксина. Также упоминается, что принятая в Европе размерность выражения концентрации эндотоксина в Международных единицах (International Unit, IU) соответствует принятому в Фармакопее США способу выражения концентрации в Единицах эндотоксина (Endotoxin Unit,

EU). В целом ничего нового или информативного этот раздел не несет.

Раздел 4. Вода для испытания на бактериальные эндотоксины. Имеет смысл привести весь текст раздела целиком:

«От подтверждения отсутствия эндотоксинов в воде на испытание бактериальных эндотоксинов (BET) с помощью испытания на кроликах отказались по следующим практическим и теоретическим причинам:

- испытание на кроликах недостаточно чувствительно для определения эндотоксинов в воде, предназначенной для испытания препаратов и имеющей очень низкое предельное содержание эндотоксинов.
- Относительно низкая прецизионность повышения температуры кроликов предусматривает много повторностей.
- Термины «пирогенные вещества» и «эндотоксины» означают группы веществ, которые полностью не совпадают.

В разделе 2.6.14 Бактериальные эндотоксины указано, что методы, за исключением метода тройной дистилляции, могут использоваться для приготовления воды ВЕТ. Использование обратного осмоса давало неплохие результаты; некоторые аналитики предпочитают проводить процесс дистилляции более трех раз. Вне зависимости от используемого метода полученный продукт должен быть свободен от поддающихся обнаружению эндотоксинов».

Если часть о нецелесообразности проверки на кроликах понятна, то способы получения воды приводятся очень путано.

Причем надо помнить, что требования к воде для ЛАЛ-теста сформулированы в Фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины», в ней нет ничего о способах получения воды для ЛАЛ-теста, но приведено основное требование к такой воде — не должна содержать эндотоксины в определяемых в тесте количествах.

Попытка развернуть тему и описать способы получения воды для ЛАЛ-теста получилась не очень удачной. Нет никакой конкретики, вопрос скорее запутан, чем развернут в конкретные рекомендации.

Раздел 5. Значение рН смеси. Раздел короткий и не очень понятный. Ниже он приведен целиком.

«В испытании на бактериальные эндотоксины оптимальное образование геля происходит в диапазоне значений рН от 6,0 до 8,0. Однако добавление ЛАЛ-реактива к образцу может приводить к понижению рН».

Последнее предложение очень странное. Почему рН снижается? Скорее выравнивается.

Опять очень мало конкретики. Вопрос значения pH испытуемого препарата действительно важен, поскольку неоптимальное значение pH до-

вольно распространенная причина ингибирования реакции. Но проверяют, как правило, препарат, разведенный водой для ЛАЛ-теста, и при этом значение рН может выравниваться. То есть рН препарата и его разведения, которое идет в анализ, могут сильно отличаться. Большое значение имеет также буферная емкость ЛАЛ-реактива, которая, кстати, разная у реактивов разных производителей.

В статье «Бактериальные эндотоксины» этому вопросу также посвящен целый раздел «Приготовление испытуемых растворов», в котором в частности говорится:

«Испытуемые растворы готовят путем растворения или разведения действующих веществ или лекарственных препаратов с использованием воды ВЕТ...

... При необходимости доводят значение pH раствора (или его разведения) так, чтобы pH смеси лизата с испытуемым раствором находилось в интервале, предписанным производителем лизата, обычно от 6,0 до 8,0».

В Фармакопейной статье раздел о рН и о способах его доведения более подробный, чем в Рекомендациях, в которых он приведен в виде краткого конспекта и не привносит никакой конкретики. А конкретика в данном случае важна. Перед аналитиком, проводящим анализ, стоит несколько вопросов:

- Нужно ли обязательно проверять рН перед анализом?
- Если проверять, то pH испытуемого раствора или pH реакционной смеси?
- Если рН испытуемого раствора выходит за указанные рамки, нужно ли его доводить до нормы или можно положиться на буферную емкость ЛАЛ-реактива?

Вот на эти конкретные вопросы нет ответа ни в Фармакопейной статье, ни в Рекомендациях. Острые углы старательно обходятся. Вместо прямых указаний, довольно туманные советы и призывы следовать рекомендациям производителей ЛАЛ-реактива.

Ответ же на главный вопрос – нужно ли измерять рН при каждом рутинном анализе (например, при ежедневной проверке одного и того же препарата), каждый аналитик должен искать самостоятельно.

Раздел 6. Валидация ЛАЛ-реактива. Ниже раздел приведен целиком:

«Важно следовать инструкции производителя по приготовлению растворов ЛАЛ-реактива.

Факторы разведения конечной точки реакции, при которых получены положительные результаты в методах А и В гель-тромб теста, преобразуются в логарифм. Преобразование обусловлено тем, что график распределения частот этих логарифмических значений обычно более согласуется с кривой нормального распределения, чем график самих факторов. Фактически они так подобны, что в качестве математической модели приемлемо использовать нормальное распределение и вычислять доверительный интервал с помощью критерия Стьюдента.

В общем все так, но зачем было упоминать метод А? Там анализ по одной точке! Какой смысл преобразовывать его в логарифм и затем получать антилогарифм этого значения?

И почему-то ничего не написано о валидации ЛАЛ-реактива для кинетических анализов. Не понятно почему комментарии затронули только гельтромб тест.

Раздел 7. Предварительное испытание на мешающие факторы. Собственно никаких подробностей в этом разделе нет. Упоминается возможность ингибирования и усиления реакции.

«...Поэтому требуется провести предварительное испытание для проверки присутствия мешающих факторов; если они обнаружены, аналитик должен подтвердить эффективность процедуры их удаления».

И еще немного о проведении анализа «Мешающие факторы»:

«Испытание на мешающие факторы в методах A и В требует использования образца препарата, в котором отсутствуют эндотоксины в обнаруживаемой концентрации. Это представляет собой теоретическую проблему в случае испытания совершенно новых препаратов».

Проблема эта скорее практического плана, надо найти несколько серий с низким содержанием эндотоксина. А вот дальше идет совершенно загадочное предложение:

«...Поэтому для количественных методов <math>C, D, E и F был разработан другой подход».

Что за подход, остается загадкой. Скорее всего имеется в виду измерение содержания эндотоксинов в образце и в образце с добавленным КСЭ. Все же в Рекомендациях можно было привести и правила действий в нестандартных ситуациях.

Раздел 8. Удаление мешающих факторов. В этом разделе из методов удаления мешающих факторов упоминается только ультрафильтрация. Указывается, что фильтры из целлюлозы могут выделять гликаноподобные вещества и сами могут быть причиной получения ложноположительных результатов. Об ультрафильтрации говорится и в Фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины», в данном случае никаких полезных подробностей не приводится.

Важное упоминание приводится в начале раздела, правда и оно повторяет указания, приведенные в фармакопейной статье.

«Способы удаления мешающих факторов не должны увеличивать или уменьшать (например, путем адсорбции) количество эндотоксина в испытуемом препарате. Корректным способом проверки эффективности выбранного способа являет-

ся проведение испытаний образцов препарата, приготовленных методом добавок, то есть образцов, в которые добавлено известное количество эндотоксина, а затем проведено его определение».

Речь идет о возможности определения известной концентрации эндотоксина в испытуемом препарате после его обработки по устранению мешающих факторов. Этот эндотоксин должен быть добавлен до начала обработки, и обработка образца не должна приводить к снижению определяемой концентрации эндотоксина.

Раздел 9. Назначение контролей. В разделе приводится разбор назначения отрицательного контроля, положительного контроля и положительного контроля испытуемого образца, которые ставятся с каждым рутинным опытом.

Описание короткое, но очень толковое.

Раздел 10. Учет и оценка результатов. Такое впечатление, что название раздела не вполне отражает его содержание. В начале говорится о том, что следовые концентрации эндотоксина, которые могут присутствовать в воде и посуде, могут быть неопределяемыми, но вместе они дают кумулятивный эффект, который может привести к выбраковке препарата. Проводится мысль о том, что лучше всего использовать вспомогательные реактивы и материалы с градацией «для ЛАЛ-теста».

И довольно интересное отношение к ложно-положительным результатам, которые могут быть вызваны недостаточно чистыми материалами.

«Даже в этом случае риск такого «ложноположительного результата» не может быть полностью исключен. Должно быть принято, что такой протокол исследования является более приемлемым в отношении безопасности больных, чем протокол испытания, допускающий получение ложноотрицательных результатов, что может приводить к выпуску препарата, не отвечающего требованиям, таким образом, подвергая опасности здоровье пациентов».

Мыль простая и логичная – лучше по ошибке забраковать хороший препарат, чем по ошибке пропустить в обращение препарат с высоким содержанием эндотоксинов.

Раздел 11. Замена испытания на пирогенность на кроликах на испытание на бактериальные эндотоксины. Раздел интересный, но несколько противоречивый. В самом начале приводится следующее базовое утверждение:

«Фармакопейные статьи на фармацевтические препараты, предназначенные для парентерального применения, которые могут содержать токсические количества бактериальных эндотоксинов, требуют проведения или испытания на бактериальные эндотоксины или испытания на пирогенность на кроликах. Общая политика такова: - в любую частную фармакопейную статью, при необходимости данного испытания, включается только одно испыта

ние, или на пирогенность или на бактериальные эндотоксины; - в отсутствие доказательства обратного, испытание на бактериальные эндотоксины предпочтительно испытанию на пирогенность, так как оно обычно рассматривается эквивалентным или обеспечивающим большую безопасность пациента».

Тут приведены три важных тезиса:

- ЛАЛ-тест или пирогенность должны быть включены в НД на парентеральные препараты.
- В Фармакопейную статью на препарат включается только один метод контроля.
- ЛАЛ-тест предпочтительнее анализа на кроликах

Далее идет речь о валидационных документах, которые должен предоставить производитель.

- «- перед включением в фармакопейную статью испытания на бактериальные эндотоксины необходимо доказать, что один из методов, описанных в статье 2.6.14 «Бактериальные эндотоксины», может эффективно использоваться при контроле испытуемого препарата;
- необходимая информация ожидается от производителей; компаниям предлагается предоставлять любые валидационные данные, которые имеют отношение к пригодности испытания на бактериальные эндотоксины для представляющих интерес веществ и готовых препаратов; такие данные включают подробное описание приготовления образца и любые процедуры, необходимые для устранения мешающих факторов; в дополнение должны быть предоставлены любые доступные параллельные данные испытания на пирогенность на кроликах, которые подкрепляют доказательства того, что замена испытания на пирогенность на кроликах на испытание на бактериальные эндотоксины применима».

С первым пунктом все понятно, хотя требования приведены не совсем конкретные. Последнее предложение входит в противоречие с утверждением, приведенным в начале раздела, где говорится, что анализы практически одинаковы, но ЛАЛ-тест лучше. Зачем тогда приводить данные по заведомо худшему анализу?

Раздел 12. Использование испытания на бактериальные эндотоксины, отличного от указанного в фармакопейной статье.

Ниже текст раздела приводится целиком:

«Когда в фармакопейной статье установлены требования по проведению испытания на бактериальные эндотоксины и не указан ни один из 6 методов (A - F), описанные в статье 2.6.14, это означает, что для данного продукта был валидирован метод A, гель-тромб-тест на предельное содержание эндотоксинов. Если указан один из других методов (B - F), это означает, что валидация пригодности этого метода для данного продукта была проведена».

Тут все понятно, кроме одного, Метод В - это тот же гель-тромб тест. Они отличаются только количеством пробирок с испытуемым образцом, которые ставятся в опыт. В Методе А ставится одно разведение, в Методе В не менее четырех. Вот и вся разница. Техника работы и реактивы одни и те же, и они оба гель-тромб тест. Для обоих вариантов анализа в Фармакопее установлены одинаковые ограничения:

- Анализ можно проводить в разведении, в котором проведен анализ Мешающие факторы.
- Максимальное разведение не должно превышать значения МДР.

Раздел 13. Валидация альтернативных методик. Раздел очень важный и ниже он приводится целиком. Первая часть:

«Замена испытания на пирогенность на кроликах на испытание на бактериальные эндотоксины, или замена установленного или применяемого метода на бактериальные эндотоксины на другой метод должна рассматриваться как использование альтернативной методики взамен фармакопейной методики согласно Общим сведениям.

Все испытания, в том числе методики количественного определения, приведенные в Фармакопее, являются официальными, на них базируются стандарты качества Фармакопеи. По согласованию с компетентным уполномоченным органом при контроле качества продукта могут использоваться альтернативные методики, обеспечивающие возможность принятия такого же однозначного решения о соответствии продукта требованиям фармакопейной статьи, как и в случае использования методик, в ней описанных. В случае сомнений или разногласий основной является фармакопейная методика».

Достаточно сложно понять, что в данном случае следует считать альтернативной методикой. Анализы «пирогенность» и «бактериальные эндотоксины» являются официальными. По ним надо равняться. Альтернативными можно считать новые и еще мало используемые методы оценки содержания эндотоксинов, такие как метод с использованием рекомбинантного фактора С или метод активации моноцитов.

Далее идет абзац о требованиях к валидационным мероприятиям. Вторая часть раздела:

«Для валидации методики испытания на бактериальные эндотоксины, отличной от испытуемой или указанной в фармакопейной статье, предлагаются следующие принципы.

- 13-1. Методика, а также материалы и реактивы, используемые в данной методике, должны быть валидированы, как описано для данного метода.
- 13-2. Присутствие мешающих факторов (и, если необходимо, способы их удаления) должно оцениваться на образцах не менее 3 производственных серий.

Следует учитывать, что методы D и E, использующие хромогенный пептид, требуют использования реактивов, отсутствующих в методах A, B, C и F. Поэтому соответствие методов A, B, C или F требованиям для мешающих факторов не может быть экстраполировано на метод D или метод E без дальнейшего исследования».

Полезная информация — проверка на трех производственных сериях. Часть же, в которой указывается, что результаты, полученные для методов А, В, С и F, не могут быть экстраполированы на методы D и E представляется не совсем верной. По сути, в ней утверждается, что гель-тромб тест (методы A и B) и турбидиметрический анализ (методы C и F) равнозначны. Поэтому можно сделать неверный вывод о том, что, если методика проведения анализа валидирована для метода A, она же может быть использована для метода С. Это не так, хотя в этих анализах и используются очень похожие реактивы.

Этот раздел Рекомендаций, пожалуй, самый важный. К сожалению, он отнесен в самый конец текста, и информация подана в очень скомканном виде. В общем-то в нем есть и неявное указание на то, что каждый метод надо валидировать отдельно. Неявно присутствует и вопрос ревалидации, — если используется другая методика, надо ее валидировать на трех сериях.

Раздел 14. Валидация испытания для новых препаратов.

«Принципы, описанные в п.п. 13-1 и 13-2, должны применяться к новым продуктам, предназначенным для парентерального применения, которые должны испытываться на присутствие бактериальных эндотоксинов в соответствии с требованиями Фармакопеи».

В самом конце Рекомендаций описано, что нужно делать при введении раздела «Бактериальные эндотоксины» в фармакопейную статью на препарат. То есть оказывается, что возможен не только переход от кроликов к ЛАЛ-тесту, но и введение раздела «Бактериальные эндотоксины» для препарата впервые.

Общие комментарии к Рекомендациям по валилации ЛАЛ-теста.

Как отмечалось во вступлении, статья «Рекомендации по проведению испытания на бактериальные эндотоксины» появилась в Европейской Фармакопее более двадцати лет назад. Изменения, которые произошли с ней за это время можно назвать косметическими правками. Принципиально статья не изменилась. Это, пожалуй, главный недостаток этого документа. ЛАЛ-тест давно уже стал самостоятельным, официальным анализом, который используется даже шире, чем анализ «пирогенность». Вместе с тем, в Рекомендациях постоянно рефреном звучит тема перехода от пирогенности к анализу «бактериальные эндотоксины». Из-за этого в тексте много внутренних противоречий:

- Анализы равнозначны.
- Включен в статью на препарат должен быть только один метод.
- ЛАЛ-тест предпочтительнее, поскольку гарантирует большую безопасность для пациента.
- ЛАЛ-тест может быть включен в фармакопейную статью на препарат впервые.

Но! Необходимо представить данные по анализу «пирогенность», проводимому на кроликах! Как это понимать? Если все делается впервые для нового препарата, то откуда возьмутся данные по пирогенности на кроликах? Этот анализ тоже далеко непростой. Необходимо рассчитывать тест-дозу препарата, учитывать индивидуальные особенности животных, их реакцию на активную субстанцию, которая может быть совершенно непредсказуемой. Наконец, нужна статистика.

А ведь об этом в Рекомендациях не сказано ни слова. Просто в Разделе 11 сказано, что <u>надо предоставлять любые доступные параллельные данные испытания по пирогенности на кроликах</u>.

Это легко написать, что надо предоставить данные, а что должен делать аналитик, который собирается валидировать ЛАЛ-тест?

Если говорить о недостатках Рекомендаций, то с нашей точки зрения, наиболее серьезным является то, что основные вопросы валидации помещены в самый подвал Рекомендаций и поданы в очень скомканном виде. К сожалению, только вскользь говорится о валидационных документах: «компании должны предоставлять любые валидационные данные, которые имеют отношение к пригодности испытания на «бактериальные эндотоксины». Очень все размыто. Опять широкая возможность трактовки этого положения.

Добавить к недостаткам Рекомендаций можно и откровенно слабые разделы:

- Стандартный материал (Раздел 3).
- Вода для испытания на бактериальные эндотоксины (Раздел 4).
- Значение pH смеси (Раздел 5).
- Валидация ЛАЛ-реактива (Раздел 6).

Они во многом повторяют аналогичные разделы фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины», причем в последней описание, как правило, подробней и понятней.

Теперь о достоинствах этого текста и полезной информации, которая в нем содержится.

На сегодняшний день официальных документов, регламентирующих правила валидации ЛАЛтеста очень мало, поэтому надо уметь пользоваться тем, что есть.

Обобщая информацию, которая так или иначе присутствует в Рекомендациях, можно найти много полезных тезисов, которые можно использовать, и на которые можно ссылаться. Интерес могут представлять следующие положения общего плана:

- Бактериальные эндотоксины наиболее распространенные пирогены, отсутствие бактериальных эндотоксинов в препарате предполагает отсутствие пирогенных компонентов.
- В фармакопейную статью на парентеральные лекарственные препараты может быть включено только одно испытание: анализ «пирогенность» или анализ «бактериальные эндотоксины».
- ЛАЛ-тест более предпочтителен, чем анализ «пирогенность», так как обеспечивает такую же или большую безопасность для пациента.
- Перед включением анализа в фармакопейную статью на препарат необходимо доказать, что один из описанных методов в фармакопейной статье «Бактериальные эндотоксины» может использоваться при контроле препарата.
- Для валидации методики нужно, чтобы сама методика, материалы и реактивы, используемые в данной методике, были валидированы.
- И в дополнение к этому требованию: материалы могут сорбировать эндотоксин и выделять ингибитор (как стекло, так и пластик), они должны предварительно проверяться (валидироваться).
- Анализ «Мешающие факторы» и, если необходимо, способы удаления мешающих факторов нужно оценивать на образцах не менее трех производственных серий.
- Для проведения анализа «Мешающие факторы» при валидации гель-тромб теста необходимо использовать серии испытуемого препарата, не содержащие бактериальных эндотоксинов.
- Способы удаления мешающих факторов не должны увеличивать или уменьшать количество эндотоксинов в испытуемом препарате.

Положения, которые не относятся напрямую к валидации метода, но очень полезны для понимания правил постановки анализа, интерпретации результатов, и касающиеся общей концепции обеспечения безопасности:

- Если в НД указан анализ «Бактериальные эндотоксины», но не указан метод, это значит, что анализ валидирован для Метода А.
- В анализе, проводимому по принципу «все или ничего», невозможно понять соответствует ли плюс (имеется в виду в МДР) предельному

- значению содержания эндотоксинов или больше этого значения. Только в случае отсутствия геля можно сделать заключение о том, что концентрация эндотоксина ниже предельного значения.
- Для повседневных испытаний препарата может быть выбрано разведение 1/2 МДР, округленное до целого числа в меньшую сторону. Однако, если результат положительный или вопрос спорный, проверка проводится точно в МДР.
- «Ложноположительные результаты», полученные из-за не очень чистых материалов и воды, это «плохо», но такой результат считается более приемлемым в отношении безопасности больных, чем «ложноотрицательные результаты», приводящие к выпуску препарата, не отвечающего требованиям, и подвергающем опасности здоровье пациентов.

Заключение.

Как упоминалось выше, официальных документов по валидации ЛАЛ-теста очень мало. В предыдущем номере мы разбирали требования FDA по валидации метода, в этом номере мы разобрали требования по валидации Европейской Фармакопеи. Остался один, пожалуй, самый подробный документ стандарт ANSI/AAMI ST72:2011, «Bacterial endotoxins—Test methodologies, routine monitoring, and alternatives to batch testing». Этим рекомендациям мы собираемся посвятить один из следующих номеров нашего бюллетеня.

Литература

«Бактериальные эндотоксины» 2.6.14. //Европейская фармакопея. Издание 8 //Полный перевод на русский язык Европейской Фармакопеи 8.0. Том 1., Стр. 256-261. Перевод и издание осуществлены ООО «Группа Ремедиум».

«Рекомендации по проведению испытания на бактериальные эндотоксины» 5.1.10. //Европейская фармакопея. Издание 8 //Полный перевод на русский язык Европейской Фармакопеи 8.0. Том 1., Стр. 792-796. Перевод и издание осуществлены ООО «Группа Ремедиум».

United States Food and Drug Administration «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» DHHS, Dec, 1987

НОВОСТИ ЛАЛ-ЦЕНТРА



Новые правила отгрузки реактивов от компании-производителя Charles River Endosafe, CIIIA

Компания-производитель ЛАЛ-реактива Charles River Endosafe, эксклюзивным дистрибьютером которой мы являемся, уведомила нас об изменении в правилах поставки ЛАЛ-реактива. С августа 2018 года в транспортные коробки с ЛАЛ-реактивами для гель-тромб теста, турбидиметрического теста и хромогенного теста больше не будут вкладываться хладагенты для поддержания низкой температуры во время транспортировки реактивов. В пресс-релизе, который выпустила компания, сообщается, что многолетние исследования стабильности лиофилизированных препаратов ЛАЛ-реактива показали их хорошую стабильность при температурах от 2°C до 25°C. Компания Charles River Endosafe получила официальное разрешение FDA на изменение правил хранения и транспортировки ЛАЛ-реактива. Потому с августа 2018 года производитель меняет правила отправки реактивов потребителю.

Мы, в свою очередь, также изменим правила отгрузки реактивов. Единственным изменением будет исключение из транспортных коробок хладагентов.

Поставками реактивов мы занимаемся уже 16 лет и знаем все о его стабильности, и в наших интересах. чтобы он дошел до потребителя, не потеряв своей чувствительности. В свое время мы проводили собственный эксперимент, заложив на хранение десяток флаконов лиофилизированного ЛАЛ-реактива при комнатной температуре. Раз в месяц мы брали один флакон, разводили его и ставили анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Так продолжалось в течение года. Чувствительность ЛАЛ-реактива соответствовала заявленной производителем в результате каждого проведенного анализа. Это был частный эксперимент, и официального значения не имел. Он важен был скорее для нас, как поставщиков ЛАЛ-реактива. И мы окончательно убедились в том, что ЛАЛ-реактив за время доставки до потребителя не утрачивает своих первоначальных характеристик.

Теперь правила транспортировки и хранения реактивов изменил производитель, и эти правила одобрены официальным регулятором - FDA. Стоит обратить внимание на то, что производитель подчеркивает, - новые правила применимы для транспортировки, а при получении реактивов им все же необходимо обеспечить температуру хранения 2-8°C. Что совершенно правильно.

Оригинал письма компании Charles River Endosafe можно посмотреть или скачать на нашем сайте в разделе «Реактивы и материалы».

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

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



ООО «НПО «ЛАЛ-Центр» 117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3а.

Тел.: (495) 517-40-37, факс: (495) 380-04-32. Е-таіl:

lalnews@Limulustest.ru

Формат: А4; Бумага: мелованная глянцевая 130 г/м²; Печать: Офсет; Объем: 8 стр.; Тираж: 100 экземпляров.

Отпечатано в типографии ООО «Типография Копиринг», Москва.