

## Колонка редактора

Мы продолжаем цикл статей, посвященных разбору положений общей фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины». В этом номере мы рассматриваем правила постановки анализа «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Этот анализ наиболее полно описан и в ОФС, и в инструкциях производителей ЛАЛ-реактива. И все же некоторые положения или, точнее, аспекты применения этого анализа до сих пор остаются «за кадром». Отчасти это связано с самим названием опыта – «подтверждение чувствительности» - название очень описательное и кажущееся исчерпывающим. И, хотя проверка работоспособности ЛАЛ-реактива - основная задача этого анализа, только этим область его применения не ограничивается. В действительности этот анализ является основным способом валидации метода, а в определенных случаях - и единственно необходимым валидационным опытом.

Интересно и то, что фрагменты этого опыта можно разглядеть и в схемах постановки рутинных анализов - как качественного, так и количественного тестов. В общем, область применения этого опыта очень широка. Поэтому правила его постановки и интерпретации результатов, безусловно, заслуживают внимательного рассмотрения.

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

## Опыт «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», его назначение и место в общей системе контрольных анализов.

Ситников. А. Г.

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» занимает особое место в системе контроля по показателю «Бактериальные эндотоксины». С него начинаются все общие фармакопейные статьи, ему уделено особое внимание и в инструкциях по применению ЛАЛ-реактива. Это не случайно, потому что значение этого опыта выходит далеко за рамки его собственного названия. Назначению этого анализа, подробному разбору способов его проведения и вариантов, в которых необходимо его повторение, посвящена эта статья.

Сразу надо отметить, что анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» имеет отношение только к гель-тромб тесту. Аналогичная по сути проверка в кинетических анализах называется «Проверка критериев достоверности калибровочной кривой» и проводится несколько иначе.

Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» подробно описан в общих статьях «Бактериальные эндотоксины» всех Фармакопей. И, поскольку он разбирается первым из всех опытов, на его примере приводятся объяснения процедуры проведения опытов, правила обработки и интерпретации полученных результатов. Не является исключением и ОФС «Бактериальные эндотоксины», в которой этот анализ также разбирается в первую очередь. А в новой редакции ОФС для большей конкретизации назначения и места этого анализа он наряду с опытом «Мешающие факторы» отнесен в отдельную группу - «Предварительные анализы». Уже само название этой группы подчеркивает, что отнесенные к ней анализы должны быть проведены до начала постановки контрольных опытов.

И хотя в ОФС не используется термин «валидация», группа опытов «Предварительные анализы» является по сути основными валидационными мероприятиями, причем анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» может быть отнесен к общей валидации метода, а анализ «Мешающие факторы» к более частной валидационной процедуре - валидации метода проверки конкретного лекарственного препарата.

Почему анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» считается первым и главным предварительным анализом? Потому что это наиболее универсальный и простой способ проверки качества ЛАЛ-реактива, и не только ЛАЛ-реактива, но и всей тест-системы в целом. На это прямо указывается в начале раздела «Предварительные анализы» ОФС:

*«Для подтверждения достоверности и точности результатов определения бактериальных эндотоксинов, проводимых с помощью ЛАЛ-реактива, необходимо подтвердить чувствительность реактива, указанную на этикетке ...». (Формулировка из новой редакции ОФС «Бактериальные эндотоксины»).*

В этом абзаце недвусмысленно указывается на прямое назначение опыта - проверка, или другими словами, валидация, реактива. В части правил, регламентируемых фармакопейной статьей, этого достаточно. Но если посмотреть на систему контроля в целом, становится очевидно, что валидация метода - это не только проверка реактива.

Так получилось, что тема валидации ЛАЛ-теста в разных его модификациях в отечественной нормативной литературе не отражена совершенно. Некоторым утешением может служить тот факт, что эта тема слабо освещена и в зарубежной литературе. Пожалуй, единственный документ, в котором вопросы валидации ЛАЛ-теста рассматриваются комплексно и подробно, - это Руководство FDA по валидации ЛАЛ-теста. Полное название этого документа "*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*". И, хотя это старый документ, к тому же официальным нормативным документом он может считаться только для фарминдустрии США, это руководство до сих пор является наиболее востребованным и часто цитируемым документом. В этом руководстве довольно подробно расписаны правила валидации метода, причем значительная часть валидационных задач решается именно с помощью опыта «Подтверждение заявленной чувствительности». Кроме проверки ЛАЛ-реактива с помощью этого опыта можно

решить еще, как минимум, две задачи: провести аттестацию работоспособности используемого оборудования (лаборатории) и проверить умение работать конкретного сотрудника. Собственно эти три задачи или этапа: лаборатория-аналитик-реактив и составляют три круга первичной валидации метода.

#### **Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» и валидация метода.**

Проведение контрольных анализов невозможно без специального лабораторного оборудования и качественных реактивов. Каким образом можно убедиться в том, что все компоненты действительно соответствуют предъявляемым требованиям? Конечно, измерительное оборудование должно быть поверено. В то же время понятно, что поверка дозаторов, бани и пр. не может однозначно гарантировать нормальной работы комплекса в целом. Следовательно, работоспособность такого комплекса необходимо валидировать, что можно сделать только с помощью модельного эксперимента, результаты которого могут быть адекватно оценены или должны быть заранее известны.

Еще один круг валидации/аттестации относится непосредственно к исполнителям. Действительно, как убедиться в том, что сотрудник усвоил правила работы и с оборудованием, и с реактивами и отдает себе отчет в том, что он делает? Ответ тоже очевиден: необходимо дать ему возможность провести такой же модельный опыт, только уже с другой целью - аттестацией специалиста.

В «Руководстве по валидации ЛАЛ-теста» прямо указывается на то, что опыт «Подтверждение заявленной чувствительности» может быть использован для:

- аттестации лаборатории;
- аттестации сотрудников;
- проверки серии ЛАЛ-реактива.

К этому можно добавить еще две задачи (цели). Это аттестация или валидация типовых методик работы (работа с ЛАЛ-реактивом, КСЭ, правила подготовки разведений). Опыт может быть проведен и с целью валидации технологии подготовки вспомогательных материалов или, скорее, с целью оценки качества готового продукта. Этот опыт, пожалуй, единственный доступный способ убедиться в том, что после цикла обработки материалы, например, вода, «.. не содержат бактериальные эндотоксины в количествах, определяемых в тесте и не оказывают влияния на ход реакции».

Получается, что с помощью этого опыта можно решить множество валидационных задач. Ниже приведена таблица, где все валидационные процедуры представлены

списком и указаны для каждой позиции условия и сроки проведения ревалидации (Табл 1).

Табл 1. Валидационные процедуры и общие правила их повторения.

| Этап валидации/аттестации            | Условия повторения   |
|--------------------------------------|--|
| ЛАЛ-реактив, КСЭ, материалы          | Новая серия ЛАЛ-реактива и КСЭ, новый поставщик материалов |
| Аттестация лаборатории               | Плановая ревалидация, новое оборудование                   |
| Аттестация сотрудников               | Плановая переаттестация, новые сотрудники                  |
| Типовые методики                     | Плановая ревалидация, изменения методик                    |
| Обработка вспомогательных материалов | Подготовка новой серии, изменение технологии               |

Стоит обратить внимание на периодичность повторения этих мероприятий. Практически все валидационные/аттестационные процедуры проводятся один раз и повторяются в соответствии с планом ревалидации, обычно не чаще одного раза в год. Лишь одна задача, занимающая первую строку списка, проверка новой серии ЛАЛ-реактива выполняется вне всяких временных планов по мере поступления новой серии реактива. На практике это означает, что этот опыт повторяется 3-4 раза в год именно с целью проверки новой партии ЛАЛ-реактива. Все остальные задачи решаются автоматически такое же количество раз. В большинстве случаев решение всех остальных задач, отличных от проверки новой серии ЛАЛ-реактива, сводится только к правильному протоколированию и ведению валидационных архивов.

Лаборатория, которая собирается ставить ЛАЛ-тест, начинает с подбора и покупки оборудования и реактивов. Предположим, что правила валидации метода новичкам еще неизвестны, но работать они будут, руководствуясь положениями ОФС. А по ОФС новая серия ЛАЛ-реактива должна быть проверена в опыте «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Это и будет самый первый опыт, проведенный на новом оборудовании. Возможно, этот анализ будет и самым первым опытом для аналитика. Подтверждение чувствительности реактива будет означать еще и то, что весь комплекс оборудования, используемого для проведения ЛАЛ-теста, валидирован, а аналитик прошел аттестацию/самоаттестацию. Получается что, даже не зная, как надо проводить валидацию и самоаттестацию, мы осуществляем эти действия и проводим их единственно правильным способом.

Продельвая опыт «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» с каждой новой серией реактивов, мы проводим эту валидацию много раз. Правила валидации подробно не описаны, и получается, что мы делаем ее неосознанно, подчас не понимая, что мы ее сделали. Но, с другой стороны, мы реально проводим такую валидацию, потому что следуем правилам статьи «Бактериальные эндотоксины», пусть в ней название опыта и не полностью отражает его многофункциональность. Важнее то, что по сути эта валидация оказывается проведенной.

Получается, что для того чтобы отметить факт проведения валидационных процедур, необходимо только правильно протоколировать результаты работы. Копия протокола этого анализа, как опыта, в котором чувствительность реактива была подтверждена, может храниться в архиве лаборатории вместе с протоколами контрольных анализов. Этот протокол будет актуален до тех пор, пока не кончится проверенная серия реактива. На него можно ссылаться в протоколах рутинных анализов, указывая в них не только номера серий ЛАЛ-реактива и КСЭ, но и номер и дату анализа, в котором они были проверены. Другая копия протокола может храниться в архиве валидационных протоколов лаборатории вместе со свидетельствами о поверке оборудования и его установочной квалификации. Аналогичным образом может быть отмечен и факт аттестации сотрудника.

Резюмировать вышесказанное можно следующим образом. Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» является универсальным средством проверки работоспособности тест-системы и может быть использован при решении валидационных задач разного уровня. Поэтому этот анализ подробно описан в фармакопейных статьях и в инструкциях на ЛАЛ-реактив. Примечательно, что при значительной разнице в текстах инструкций различных производителей ЛАЛ-реактива в той части инструкций, которая относится к анализу «Подтверждение заявленной чувствительности», они почти идентичны. Учитывая важность этого опыта, имеет смысл подробно рассмотреть рекомендуемую схему его постановки, правила подготовки растворов КСЭ, а также правила интерпретации результатов.

#### **Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности» в ОФС «Бактериальные эндотоксины».**

Схема проведения этого опыта в старой и новой редакциях ОФС «Бактериальные эндотоксины» примерно одинакова (Рис. 1).

Рис 1. Схема проведения опыта в новой редакции ОФС

| Раствор | Исходный раствор  | Растворитель       | Фактор разведения | Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе | Количество повторностей |
|---------|---|--------------------|-------------------|---|-------------------------|
| С       | Раствор КСЭ в воде для ЛАЛ-теста с концентрацией КСЭ - 2λ | Вода для ЛАЛ-теста | 1                 | 2λ  | 4                       |
|         |   |                    | 2                 | 1λ  | 4                       |
|         |   |                    | 4                 | 0,5λ  | 4                       |
|         |   |                    | 8                 | 0,25λ   | 4                       |
| Д       | Вода для ЛАЛ-теста  | -                  | -                 | -   | 2                       |

По сравнению с ОФС 42-0002-00 эта схема принципиальных изменений не претерпела, за исключением замены индексов, используемых для обозначений растворов. В новой редакции растворы КСЭ идут под индексом «С», а вода для ЛАЛ-теста под индексом «Д». Это связано с тем, что далее в тексте статьи во всех схемах опытов отрицательный контроль (вода для ЛАЛ-теста) - это растворы Д, а положительный контроль (т.е. растворы КСЭ) везде идут под индексом С.

Способ подготовки отрицательного контроля вопросов обычно не вызывает. Несколько сложнее дело обстоит с серией растворов КСЭ, которая используется для проверки чувствительности ЛАЛ-реактива. Начать стоит с колонки «Исходный раствор». В данном контексте это раствор КСЭ с концентрацией, равной 2λ, где λ (лямбда) - чувствительность ЛАЛ-реактива в ЕЭ/мл. Далее этот исходный раствор КСЭ разводят, при этом значение разведения указано в колонке «Фактор разведения». Растворителем является вода для ЛАЛ-теста. В опыте ставят четыре разные концентрации исходного раствора КСЭ: от неразведенного с концентрацией 2λ (фактор разведения - 1) до разведенного с концентрацией 0,25λ (фактор разведения - 8). Каждый из этих растворов испытывается в четырех повторностях, и конечный объем каждого из этих растворов должен быть не менее 0,5 мл. В целом, эта схема значительно проще выглядит в виде таблицы, которую заполняют по результатам опыта (Табл. 2).

В статье подробно описаны условия достоверности опыта и правила интерпретации результатов.

#### Результаты и интерпретация.

Анализ считают достоверным в том случае, если:

- для раствора Д (отрицательный контроль) во всех повторностях получены отрицательные результаты,

- для раствора С с концентрацией 0,25λ получены отрицательные результаты.

Конечной точкой реакции для каждой из повторностей растворов С является положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрации КСЭ. По этим результатам рассчитывается среднее

геометрическое значение чувствительности ЛАЛ-реактива по следующей формуле:

$$\text{Среднее геометрическое значение концентраций КСЭ в конечной точке реакции} = \text{antilog} \frac{\sum e}{f}$$

где  $\sum e$  - сумма логарифмов концентраций КСЭ в конечной точке реакции в каждой из повторностей,  $f$  - число повторностей.

Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной и используется в дальнейших расчетах в том случае, если полученное в эксперименте значение чувствительности ЛАЛ-реактива не менее 0,5λ и не более 2λ.

Эти положения имеет смысл разобрать более подробно, тем более что некоторые из них иногда вызывают вопросы.

С отрицательным контролем все понятно, он должен быть отрицательным, если нет, то опыт недействителен.

Для того чтобы понять, почему для концентрации 0,25λ должны быть получены отрицательные результаты, и зачем надо ставить в опыт концентрацию КСЭ, которая на первый взгляд только дублирует отрицательный контроль, необходимо обратиться к приведенному абзацу, где оговариваются возможные варианты результатов. Приемлемые результаты находятся в диапазоне от 2λ до 0,5λ. Для уверенности в том, что по результатам опыта чувствительность действительно равна 0,5λ, необходимо поставить в тест КСЭ с концентрацией 0,25λ. В противном случае невозможно будет говорить о конечной точке реакции. Т.к. частное определение конечной точки реакции при количественном анализе - это «положительный результат, полученный для раствора с наименьшей концентрацией КСЭ». Это определение предполагает, что в ряду разведений КСЭ есть, как минимум, одна концентрация КСЭ, для которой получен отрицательный результат. Если в ряду разведений для всех концентраций получены положительные результаты, конечная точка не определена. Что будет, если исключить из схемы опыта одну точку (0,25λ), можно проиллюстрировать на следующих примерах (Табл. 2 и 3).

Табл. 2. Таблица результатов анализа, проведенного по стандартной схеме.

|   | 2λ | λ | 0,5λ | 0,25λ | К- |
|---|----|---|------|-------|----|
| 1 | +  | + | +    | -     | -  |
| 2 | +  | + | +    | -     | -  |
| 3 | +  | + | +    | -     | -  |
| 4 | +  | + | +    | -     | -  |

Конечная точка реакции определена для каждой из повторностей, она равна 0,5λ. Чувствительность реактива, определенная в опыте, соответствует приемлемым критериям.

Табл. 3. Таблица результатов анализа, проведенного по «укороченной» схеме.

|   | 2λ | λ | 0,5λ | 0,25λ | К- |
|---|----|---|------|-------|----|
| 1 | +  | + | +    | н/о   | -  |
| 2 | +  | + | +    | н/о   | -  |
| 3 | +  | + | +    | н/о   |    |
| 4 | +  | + | +    | н/о   |    |

Способность ЛАЛ-реактива реагировать с КСЭ с концентрацией 0,25λ не определялась. Экономия составила 0,4 мл ЛАЛ-реактива. По результатам анализа конечная точка не определена. Можно только говорить о том, что чувствительность равна или больше 0,25λ. А насколько «больше» - неизвестно. Результаты отрицательного контроля свидетельствуют только о том, что растворитель (вода для ЛАЛ-теста) и посуда не содержат эндотоксинов, но этого недостаточно для того, чтобы принять решение о соответствии/не соответствии ЛАЛ-реактива заявленной чувствительности. В итоге опыт придется переставлять по полной схеме.

Иногда возникает вопрос: почему серия концентраций КСЭ не раздвигается и в большую сторону, т.е. до концентрации 4λ? Ответ напрашивается сам собой. Если при 2λ получен отрицательный результат, то чувствительность реактива точно будет более чем вдвое ниже заявленной, а будет ли она равна 4λ - уже неважно. В данном случае поиски конечной точки не нужны. Иногда в инструкциях к ЛАЛ-реактиву в части, описывающей этот анализ, можно встретить КСЭ в концентрации 4λ. Чем руководствовались авторы таких инструкций, совершенно непонятно.

Теперь стоит перейти к той части обработки результатов анализа, которая вызывает наибольшие проблемы. Это расчеты чувствительности ЛАЛ-реактива, определенной в опыте. Рассчитываться должно среднее геометрическое значение, и в статье приведена формула расчета. На первый взгляд сложно и непонятно. Но, если разобраться, все не так уж и сложно. Во-первых, если во всех повторностях получены одинаковые значения, ничего усреднять не нужно, и это значение принимается за результат опыта. Среднее геометрическое значение рассчитывается только в том случае, когда для разных повторностей получены разные результаты. Зачем нужна математика? Понять целесообразность такой обработки данных можно, если сравнить калибровочные кривые, построенные по стандартному ряду концентраций КСЭ и по логарифмам этих значений (Рис. 2 и 3):

Рис. 2. Калибровочная кривая, построенная для стандартного ряда разведений КСЭ с концентрацией от 1,0 ЕЭ/мл до 0,015 ЕЭ/мл

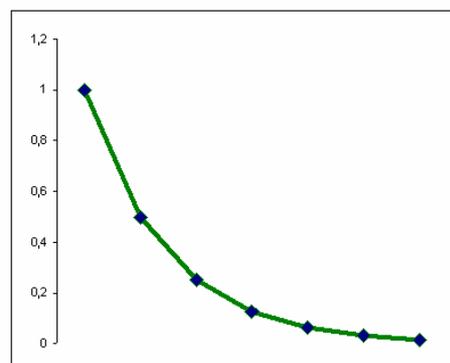
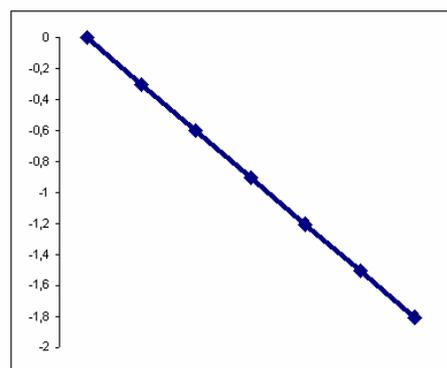


Рис. 3. Калибровочная кривая, построенная по логарифмам значений концентраций КСЭ от 1,0 ЕЭ/мл до 0,015 ЕЭ/мл.



Несложно заметить, что во втором случае получается четкая линейная зависимость, все точки располагаются на одной прямой и с равными интервалами. Соответственно, и промежуточные значения могут быть определены с большей точностью. Однако для этого промежуточные значения надо сначала перевести в логарифмы, рассчитать их среднее значение, и потом полученную цифру перевести в более понятное значение концентрации КСЭ в ЕЭ/мл, т.е. совершить действие, обратное логарифмированию - определить антилогарифм среднего значения.

Впрочем, если отвлечься от математики и перейти к арифметике, т.е. к расчету среднего арифметического значения, то результат будет «грубым», но он не очень сильно будет отличаться от «идеального» (Табл. 4).

Табл. 4. Разные варианты обработки результатов опыта (для ЛАЛ-реактива с λ = 0,03 ЕЭ/мл, концентрации КСЭ указаны в ЕЭ/мл)

|   | 0,06 | 0,03 | 0,015 | 0,0075 | Конечная точка |
|---|------|------|-------|--------|----------------|
| 1 | +    | +    | +     | -      | 0,015          |
| 2 | +    | +    | -     | -      | 0,03           |
| 3 | +    | -    | -     | -      | 0,06           |
| 4 | +    | -    | -     | -      | 0,06           |

Среднее геометрическое значение - 0,035 ЕЭ/мл.

Среднее арифметическое значение - 0,041 ЕЭ/мл.

Если учесть, что для реактива с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл допустимыми могут быть значения от 0,015 ЕЭ/мл до 0,06 ЕЭ/мл, то «неточность» расчетов среднего арифметического значения не влияет на окончательный вердикт: **чувствительность ЛАЛ-реактива подтверждена.** Расчеты - это промежуточный этап обработки результатов опыта, на основе расчетов делается вывод. И на этот вывод принцип расчетов не оказывает серьезного влияния.

В упрощении оценок результатов опыта можно пойти и дальше. В ОФС условия, при которых опыт считается достоверным, сформулированы таким образом, что если результаты не укладываются в оговоренные рамки, то необходимость в расчетах отпадает. Для того, чтобы совсем упростить интерпретацию результатов, можно рекомендовать использовать схему, приведенную в Табл. 5.

Табл. 5. Условия, при которых опыт может считаться достоверным.

|   | 2λ | λ   | 0,5λ | 0,25λ | К- |
|---|----|-----|------|-------|----|
| 1 | +  | +/- | +/-  | -     | -  |
| 2 | +  | +/- | +/-  | -     | -  |
| 3 | +  | +/- | +/-  | -     |    |
| 4 | +  | +/- | +/-  | -     |    |

В невыделенных цветом ячейках результаты могут разными (+ или -). Серым цветом выделены ячейки, в которых результаты должны быть однозначными (только плюс или только минус). Если результаты опыта укладываются в эти рамки, то расчеты можно и не проводить, а чувствительность ЛАЛ-реактива можно считать подтвержденной.

Таким образом, понять, что получилось, можно сразу, достаточно взглянуть на таблицу результатов. Обсчет этих результатов является формальной операцией. Но, если такие расчеты делаются, то делать их следует по правилам, приведенным в ОФС.

И еще одно замечание: фраза «...Заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной и используется в дальнейших расчетах...» означает, что вне зависимости от того, какой количественный результат получен в опыте, он является справочным (промежуточным, т.е. используется только для того, чтобы сделать правильный вывод), это не «реальная» чувствительность ЛАЛ-реактива. Реальная чувствительность указана на этикетке. Поэтому при дальнейшей работе с этим реактивом используется значение чувствительности, указанное на этикетке. В сущности, опыт называется «Подтверждение заявленной чувствительности», а не «определение чувствительности».

### Подготовка растворов КСЭ для проведения опыта.

Выше отмечалось, что в инструкциях к ЛАЛ-реактиву для гель-тромб теста разных производителей в части описания опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» схемы его подготовки практически идентичны. Причину единого подхода следует искать в самых первых редакциях статей «Бактериальные эндотоксины» Фармакопеи США и даже в «дофармакопейный» период, когда только отрабатывались вопросы стандартизации КСЭ и калибровки ЛАЛ-реактива. Для этой калибровки была рекомендована вполне определенная схема подготовки разведений стандарта эндотоксина. И сегодня эти принципы и правила, заложенные более тридцати лет назад, остаются в силе.

Типовая схема подготовки растворов после разведения лиофилизированного препарата КСЭ может быть условно разделена на два этапа.

Первый этап - доведение концентрации исходного раствора КСЭ до 1,0 ЕЭ/мл. Обычно это несколько последовательных разведений исходного раствора с шагом не более чем в 10 раз.

Второй этап - получение растворов КСЭ с концентрациями, которые будут поставлены в опыт (2λ, λ, 0,5λ и 0,25λ). Для этого делают серию последовательных двукратных разведений, начиная с раствора с концентрацией 1,0 ЕЭ/мл. Рекомендуемые объемы КСЭ и воды для ЛАЛ-теста обычно по 1,0 мл. Схема подготовки разведений на втором этапе выглядит следующим образом.

Табл. 6. Стандартная схема подготовки разведений КСЭ

| Пробирка № | Вода (мл) | Объем КСЭ, добавленный к воде | Конц-я эндотоксина, ЕЭ/мл |
|------------|-----------|-------------------------------|---------------------------|
| 1          | 1,0       | 1 мл с конц. 1 ЕЭ/мл          | 0,5                       |
| 2          | 1,0       | 1 мл из пробирки №1           | 0,25                      |
| 3          | 1,0       | 1 мл из пробирки №2           | 0,125                     |
| 4          | 1,0       | 1 мл из пробирки №3           | 0,06                      |
| 5          | 1,0       | 1 мл из пробирки №4           | 0,03                      |
| 6          | 1,0       | 1 мл из пробирки №5           | 0,015                     |

и т.д. до концентрации, соответствующей 0,25λ

Эта последовательность полностью повторяет схему разведений Международного стандарта эндотоксина, который используется для определения чувствительности новой серии ЛАЛ-реактива. Несмотря на то, что приведенная схема подготовки анализа выглядит несколько перегруженной, нет оснований вносить в нее серьезные

изменения. Анализ важен, перестановка его нежелательна, поэтому лучше потратить несколько лишних пробирок и быть уверенными в том, что на результаты не оказали влияния технические ошибки, связанные с подготовкой разведений КСЭ. Единственное, что можно изменить совершенно безболезненно, то это объемы воды и КСЭ. Практика показывает, что без ущерба для точности разведений эти объемы вполне могут быть сокращены до 0,5 мл.

#### **Подтверждение чувствительности ЛАЛ-реактива и рутинные анализы.**

Концепция, положенная в основу анализа «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», буквально пронизывает всю систему проверки лекарственных препаратов по показателю «Бактериальные эндотоксины». Действительно, если внимательно присмотреться к схемам проведения качественного и количественного анализов, можно заметить, что в каждом из них присутствуют фрагменты анализа «Подтверждение заявленной чувствительности» (Табл. 7-9).

В несколько сокращенном виде он повторяется в количественном анализе в качестве положительного контроля опыта. Используются те же концентрации КСЭ и вода, но в опыте они ставятся в двух повторностях. Вообще, такой контроль опыта можно назвать «расширенным», и его рекомендуют проводить ежедневно в первом опыте (инкубировании), причем неважно, качественный это опыт или количественный. По результатам, полученным для такого контроля, можно судить об изменениях, которые произошли с ЛАЛ-реактивом во время его хранения как в лиофилизированном, так и в замороженном виде.

В качественном анализе можно тоже увидеть остатки схемы анализа «Подтверждение заявленной чувствительности», но в редуцированном виде. Из четырех разных концентраций КСЭ оставлена только одна 2λ, в которой обязательно должен образоваться гель. Также оставлен отрицательный контроль, который во всех опытах проводится в двух повторностях.

*Табл. 7. Анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива»*

|   | 2λ | λ | 0,5λ | 0,25λ | К- |
|---|----|---|------|-------|----|
| 1 | +  | + | -    | -     | -  |
| 2 | +  | + | -    | -     | -  |
| 3 | +  | + | -    | -     | -  |
| 4 | +  | + | -    | -     | -  |

Самостоятельный опыт, целью которого является проверка качества новой серии ЛАЛ-реактива.

*Табл. 8. Анализ стандартной серии разведений КСЭ*

|   | 2λ | λ | 0,5λ | 0,25λ | К- |
|---|----|---|------|-------|----|
| 1 | +  | + | -    | -     | -  |
| 2 | +  | + | -    | -     | -  |

Фрагмент контрольного анализа, цель - подтверждение неизменности качества реактивов при хранении. Анализ необходимо проводить периодически, желательно ежедневно с первым инкубированием.

*Табл. 9. Положительный и отрицательный контроли опыта*

|   | 2λ | К- |
|---|----|----|
| 1 | +  | -  |
| 2 | +  | -  |

Фрагмент контрольного анализа, цель - простое подтверждение работоспособности ЛАЛ-реактива.

Несложно заметить, что основным стержнем системы обеспечения достоверности рутинных анализов является анализ «Подтверждение заявленной чувствительности», с него все начинается, и фрагменты этого анализа присутствуют в каждом опыте.

#### **Условия, при которых необходимо повторение опыта.**

В ОФС о необходимости повторения опыта сказано следующее:

*«Анализ проводят для каждой новой серии используемого ЛАЛ-реактива, а также при изменении условий эксперимента, используемых материалов и реактивов, способных повлиять на результаты теста.»*

Этот фрагмент оставляет довольно широкие возможности для трактовки особенно в той части, которая касается изменений условий проведения опыта, используемых материалов и т.д. Но, как уже отмечалось выше, основным условием повторения опыта является получение новой серии ЛАЛ-реактива. Точнее, даже не серии, а вновь поступивших реактивов. Даже если номер новой серии совпадает с номером серии уже проверенного реактива, опыт должен быть проведен, поскольку в данном случае основная его задача заключается в подтверждении того, что реактив не утратил своих свойств в результате транспортировки.

В заключение разберем вопросы оформления результатов опыта. Анализ важен и его результаты актуальны, как минимум, до тех пор, пока не кончится проверенная серия ЛАЛ-реактива. Следовательно, и оформлены эти результаты должны быть соответствующим образом. Единой рекомендованной формы оформления протоколов анализа нет, тем не менее, можно выделить некоторые позиции, которые желательно отразить в протоколе:

- Назначение анализа (Подтверждение чувствительности, валидация оборудования, аттестация и т.д.);
- Сведения о ЛАЛ-реактиве (номер серии, чувствительность реактива);
- Сведения о КСЭ (номер серии, количество ЛПС во флаконе, активность КСЭ в ЕЭ/нг и концентрация КСЭ в исходном растворе в ЕЭ/мл);
- Представление данных опыта в табличной форме;
- Расчетное значение чувствительности ЛАЛ-реактива по результатам опыта;
- Выводы (заявленная чувствительность соответствует/не соответствует значению, указанному на этикетке);
- ФИО аналитика, проводившего опыт;
- Дату проведения опыта.

#### Литература

ОФС 42-0002-00 «Бактериальные эндотоксины» Москва, 2000 г.

Проект ОФС «Бактериальные эндотоксины».

*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 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.*

*Лизат Амебоцитов Limulus Endosafe Инструкция по применению // Charles River Endosafe.*

### «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](mailto: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.

Подписано к печати: 04.07.2007 г.

Формат: А4; Бумага: супербелый лен 90 г/м<sup>2</sup>; Печать: Офсет; Объем: 8 стр.; Тираж: 400 экземпляров.

Отпечатано в типографии ООО «Формула Цвета», Москва.



**ЛАЛ-ЦЕНТР**

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