

Некоторые преимущества кинетических методов контроля бактериальных эндотоксинов над гелем-тромб-тестом

Исрафилов А.Г.

Заведующий лабораторией вирусных препаратов
филиала "Иммунопрепарат" г. Уфа АО «НПО «Микроген»

Тутнова А.Д.

Старший специалист по клеточным технологиям
ООО «Альгимед»

Значимым недостатком «неспецифического» качественного метода контроля пирогенности на кроликах является в 10 раз более высокая чувствительность людей к пирогенам по сравнению с кроликами (Cooper J.F., J. Levin, H.N. Wagner., 1971; Wolff S.M., 1973), а также известные случаи толерантности отдельных кроликов к пирогенам (<https://www.pharmaguideline.com/2011/04/bacterial-endotoxin-test-beta-validation.html#gsc.tab=0>), что может создавать очевидный риск пирогенных реакций для пациентов (вплоть до жизнеугрожающих состояний – асептический шок, летальность) на введение препаратов. Кроме того, тест *in vivo* контроля пирогенности на кроликах отличается высокой вариабельностью (низкой воспроизводимостью), высокой стоимостью (Hilderband M., 2005) по сравнению с методами *in vitro*. Поэтому считаем необходимым обязательное тестирование эндотоксинов в препаратах, относимых к группе массового применения, типа вакцин, включенных в Национальный календарь профилактических прививок или вводимых в большом объеме, т.е. к трансфузионным/инфузионным препаратам, к которым относится и препарат альбумина, с помощью ЛАЛ-теста.

Особое или главное или даже первое место по значимости при контроле на эндотоксины/пирогены принадлежит препарату альбумину из-за его самых высоких сорбционных свойств к любым соединениям, в том числе и эндотоксинам, по сравнению с другими белками. Согласно документу Technical Guide for the Elaboration and Use of Monographs on Human Plasma-derived Products в общей монографии для всех препаратов плазмы крови, для препарата альбумина рекомендован двойной контроль на пирогенность и эндотоксины. В минимальных требованиях Японии (Human albumin. 3.9. Pyrogen test) приоритетным методом является тест на эндотоксины, тест на пирогенность проводится только в том случае, когда содержание БЭ превышает установленный критерий 0,6 ЕЭ/мл. Для повышения безопасности по показателю «пирогенность» для препаратов альбумина один из

лидеров производства препаратов плазмы крови, фирма Baxter (<https://www.pharmaguideline.com/2011/04/bacterial-endotoxin-test-bet-validation.html#gsc.tab=0>), отдает предпочтение ЛАЛ-тесту: частота контроля ЛАЛ-тестом (143 196) в 5 раз превышает частоту проведения теста на кроликах (28 410). В официальном руководстве Евросоюза по получению разрешения на реализацию серии препарата альбумина человека (Official Control Authority Batch Release of Human Albumin. Guideline for Human Albumin. Human Blood Derived Medical Products) приводится следующий алгоритм контроля: для промежуточной проверки полуфабриката проводится тест на кроликах, а для официального выпуска серии осуществляется обязательный параллельный контроль как на кроликах, так и с помощью ЛАЛ-теста. Интересен комментарий European Medicines Agency (ЕМЕА/СНМР/ВWР/452081/2007): при наличии противоречивых результатов параллельных тестов – на эндотоксины и пирогены – серии препарата не могут быть выпущены, т.е. приоритет при решении имеют оба метода оценки. В монографии Европейской Фармакопеи № 0255 на препарат альбумина человека говорится о приоритетности ЛАЛ-теста только при условии, что все пирогенные субстанции являются эндотоксинами, а также получены положительные результаты валидации метода. В случае отрицательных результатов валидации приоритет отдается тесту на кроликах.

При проведении валидации ЛАЛ-теста необходимо применять индивидуальный подход, учитывающий возможность влияния цветности и мутности на результаты хромогенного и турбидиметрического методов (Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs 1987/2011; Joiner T.J., P.F. Kraus, T.C. Kupiec., 2002).

Главным экономичным стимулом перехода от контроля пирогенности на кроликах к контролю эндотоксинов является финансовый и информация по безопасности группы Travenol, которая доказала, что серии препарата альбумина, которые прошли по тесту на пирогенность на кроликах, оказались пирогенными при применении этих препаратов людям, подтвержденными как небезопасные по тесту на бактериальные эндотоксины. В результате FDA приняло решение об обязательном тестировании на бактериальные эндотоксины всех новых серий препарата альбумина, даже если эти серии оказались апирогенными при контроле на кроликах официальным фармакопейным методом (Dawson M.E., 2010). Следовательно, отечественный российский производитель, заинтересованный в выпуске безопасного апирогенного препарата альбумина, обязан тестировать его и на содержание эндотоксинов ЛАЛ-тестом (тестом *in vitro*), который имеет большую приоритетность. Так как только метод *in vitro* способен выявить до поры до времени скрытый или связанный эндотоксин, поскольку предусматривает специальную пробоподготовку – экстракцию/выявление всего эндотоксина,

в отличие от контроля на пирогенность на кроликах, которая пока выявляет только свободный (не связанный с белком) пироген из-за отсутствия пробоподготовки для теста на пирогенность. Приоритетность ЛАЛ-теста над пирогенностью обусловлена именно снижением рисков, так как скрытый пироген совместно со свободным выявляет только ЛАЛ-тест, и в отличие от теста пирогенность на кроликах, он предусматривает проверку на влияние мешающих факторов или на ингибирование. Исходя из вышеизложенного, большинство стран мира проводит проверку содержания пирогенов двумя обязательными методами: и на кроликах, и методом *in vitro* (ЛАЛ тестом).

Для качественного и количественного определения содержания эндотоксинов разработаны три принципиально отличающихся между собой варианта ЛАЛ- теста:

- 1) гель-тромб-тест, в котором результаты оцениваются визуально по образованию устойчивого геля;
- 2) турбидиметрический метод – с инструментальной оценкой результатов по образованию помутнения реакционной смеси;
- 3) хромогенный метод – с инструментальной оценкой результатов по образованию окрашивания, возникающего в результате введения в реакционную смесь хромогенного субстрата взамен коагулогена.

Сравнение трех основных классических методов контроля эндотоксинов дано в таблице.

Таблица – Сравнительный анализ классических основных методов контроля бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста

Характеристики	гель-тромб-тест	турбидиметрический метод (кинетический)	хромогенный метод (кинетический)	Примечание
Метод	Качественный, полуколичественный варианты. Метод золотого стандарта. Главенство результатов гель тромб-теста над остальными вариантами (кинетически ми) и при любых	Только количественный (При отсутствии эндотоксинов в тестируемом диапазоне ответ будет менее нижней точки дипазона).	Только количественный (При отсутствии эндотоксинов в тестируемом диапазоне ответ будет менее нижней точки дипазона).	Гель-тромб-тест является арбитражным методом по Фармакопее, однако не относится к количественным методам оценки. Допустимая ошибка метода 50-200% относится ко всем методам ЛАЛ-теста, поэтому реальное содержание БЭ в образце может быть в диапазоне 50-200% от значения,

	противоречиях.			полученного и в инструментальном анализе.
Оценка реакции	Субъективная (возможна человеческая ошибка)/ До тех пор, пока процесс тестирования эндотоксинов не будет полностью автоматизирован, с минимальным вмешательством человека, субъективность может повлиять на результат.	Инструментальная (объективная).		Преимущество кинетических методов по приборному обеспечению и объективности оценки.
Требования к квалификации персонала	Обучение	Обучение. Более высокие требования к квалификации, так как есть необходимость работы на спектрофотометре, программном обеспечении, компьютере.		Более высокие требования к квалификации персонала для кинетических методов.
Соответствие требованиям GMP. Документируемость. Объективность. Прослеживаемость/ ретроспективность. Невозможность изменить полученные данные. Защищенность программного обеспечения.	Отсутствует	Имеется	Имеется	Кинетические методы соответствуют требованиям GMP. Объективность инструментальных методов с программным обеспечением.
Чувствительность, ЕЭ/мл	0,015 (0,03)	0,005 (0,01) (микропланшетный) 0,001 (пробирочный). Чувствительность до 0,001 ЕЭ/мл дают реактивы только в сочетании со специальными	0,005	Примерно в 2-3 раза (микропланшетный вариант) более высокая чувствительность кинетических методов. Пробирочный вариант кинетических методов имеет

		<p>пробирочными ридерами, например Pyrotell-T в сочетании с ридером Pyros Kinetix или Pyrostar ES-F с ридером Toxinometer. Для этих ридеров используются специальные пробирки и отдельное ПО.</p>		<p>некоторые недостатки, так как по количеству ручных операций приближается к гел-тромб тесту, хотя по чувствительности на порядок выше гел-тромб теста.</p>
Рабочий диапазон	<p>Чувствительность ЛАЛ-реактива, указанная на этикетке.</p>	<p>0,001–100 ЕЭ/мл (с пробирочными ридерами). От 0,005–50 ЕЭ/мл до 0,01-100,0 ЕЭ/мл (с планшетными ридерами). Возможность проведения анализа в одном разведении.</p>	<p>0,005–50 ЕЭ/мл. Возможность проведения анализа в одном разведении. ЛАЛ-реактив Limulus Color KY производства Wako Chemicals имеет диапазон чувствительности от 0,0005 до 5 ЕЭ/мл в планшетном ридере. При этом в каждую лунку требуется 50 мкл реактива (в два раза меньше по сравнению с другими производителями). Цена практически не меняется от уровня содержания эндотоксинов (разведения) в образце https://thenativeantigencompany.com/endotoxin-testing-services/</p>	<p>Для полуколичественного определения гел-тромб тестом требуется приготовление большого ряда разведений, в некоторых случаях сначала 10-кратных, 1;10;100;1000;10000;100000; 1000000; а затем 2-кратных, для более точного определения, особенно на стадиях технологического процесса, где неизвестно точное содержание эндотоксинов. Для кинетических методов достаточно одного разведения, как правило намного меньшего, меньше ошибка, попадание ниже верхней точки кривой. Однако только на стадии отработки методики для неизвестного препарата в кинетических анализах также требуется ставить несколько разведений, обычно десятикратных, так как неизвестно, в каком разведении</p>

				уже не будет влияния мешающих факторов.
Преимущество использование	Как правило для конечного препарата, обычно в трех разведениях: 1/2МДР, МДР и в разведении, соответствующем точке риска (принятия дополнительных мер предупредительного характера). Ограниченность по другим материалам и стадиям из-за невозможности выбора сразу оптимальных разведений, особенно при невозможности результатов на стадиях и в материалах.	Для любых стадий, любых полуфабрикатов, субстанций, вспомогательных веществ, поверхностей оборудования, медицинских устройств, материалов и т.д. из-за широкого рабочего диапазона.	Для любых стадий, любых полуфабрикатов, субстанций, вспомогательных веществ, поверхностей оборудования, медицинских устройств, материалов и т.д. из-за широкого рабочего диапазона.	Больше объектов исследований, большая гибкость для кинетических методов. Поэтому кинетические методы могут быстро дать представление о потенциальных источниках загрязнения эндотоксинами конечных препаратов и предпринять меры по снижению уровня эндотоксинов.
ЛАЛ-реактив	Классический ЛАЛ-реактив, общий для гель-тромб теста и турбидиметрического анализа, что позволяет ожидать получения более близких результатов для обоих методов тестирования.		Модифицированный ЛАЛ-реактив, в который добавлен искусственный хромогенный субстрат. Поэтому окрашенные препараты могут оказывать влияние на ход реакции.	Хромогенный ЛАЛ-реактив может быть менее подвержен влиянию ингибирования, так как содержит искусственный хромогенный субстрат в отличие от природного ЛАЛ-реактива.
Восприимчивость к мешающим факторам	Устойчивый, обычно менее восприимчив к мешающим факторам,	Более восприимчивы к мешающим факторам, чем гель-тромб-тест, но более высокая чувствительность, как правило, позволяет нивелировать их большим разведением образцов,		Примерно одинаковая, с учетом возможности большего разведения для кинетических методов. Однако в

	чем другие методы	однако в сложных случаях имеет преимущество гель-тромб тест.		гель-тромб тесте результаты в положительном контроле препарата оцениваются визуально, не требуется попадания в определенный диапазон 50-200% от добавленной концентрации эндотоксина, поэтому результаты с меньшей вероятностью подвержены ингибированию или усилению из-за свойств испытуемого образца.
Температурный контроль	Стандартный.	Температурный контроль более жесткий. Контролируется программным обеспечением.		Преимущество кинетических методов в связи с возможностью документирования фактической температуры.
Возможность одновременного анализа большого количества образцов	Ограниченное количество образцов для конечного препарата из-за трудоемкости ручных операций при постановке большого числа образцов.	Как правило, ограничивается одним микропланшетом – 96 лунок.		Ограниченность гель-тромб теста по количеству одновременно анализируемых образцов. Возможность проверки большего числа образцов за один анализ для кинетических методов. Время, которое требуется для подготовки образцов для гель-тромб теста, и трудоемкость ручных операций сделало его менее популярным.
Автоматизируемость, использование программного обеспечения.	Отсутствует.	Возможность. Плюсы работы с программой – готовые протоколы, сохранение данных.	Возможность. Плюсы работы с программой – готовые протоколы, сохранение данных.	Преимущество кинетических методов в использовании автоматизации и программного обеспечения.
Инструментальность	Ограничена.	Не ограничена.	Не ограничена.	Преимущество кинетических методов.

Масштабируемость, микропланшетный 96-ти луночный вариант	Отсутствует.	Имеется.	Имеется.	Преимущество кинетических методов по масштабируемости.
Количество пробирок/лунок на (полу)количественный анализ.	минимум 10 пробирок на препарат и 10 пробирок с контролями	4 точки с препаратом на микропланшет (калибровка 10 лунок для одного инкубирования)	4 точки с препаратом на микропланшет (калибровка 10 лунок для одного инкубирования)	Кинетические методы выгоднее по затратам времени и в конечном итоге по стоимости при большом количестве анализов с учетом большего количества пробирок и объема реактивов.
Стоимость капитальных затрат	Минимум капитальных затрат.	Больше капитальные вложения на стадии закупки оборудования, программы, компьютера.	Больше капитальные вложения на стадии закупки оборудования, программы, компьютера.	Для кинетических методов большие капитальные затраты.
Стоимость текущих затрат	Примерно одинаковые	Текущие затраты значительно ниже для турбидиметрического анализа, так как цена за ЛАЛ-реактив такая же, как и для гел-тромб теста, а расход в два раза меньше для реактива Pyrostar ES-F/plate Wako Chemicals (50 мкл против 100 мкл в одну лунку) и в некоторых случаях для Pyrotell®-T (после валидационных испытаний).	Цена для хромогенного реактива в среднем по рынку выше, чем для турбидиметрического, так как его производство требует больших затрат (вставка хромогенного субстрата в природный ферментативный каскад амебоцитов).	Стоимость текущих затрат по реактиву для турбидиметрического метода примерно в 2 раза ниже чем для гел-тромб теста на 1 пробу.
Стоимость пробирки/микропланшета	Например, пробирки для ЛАЛ-теста «AL-Tube» 10x75 мм 50 шт/упак стоят 10 \$ за упаковку, 20 центов за пробирку. Один анализ – 10 пробирок – 2 \$.	Например, планшет Corning 96-ти луночный стерильный в индивидуальной упаковке. Corning, США кат № 3599, 1 шт - 1,50 \$ за планшет. Одна лунка – 1,56 центов. 1 разведение (4	Например, планшет Corning 96-ти луночный стерильный в индивидуальной упаковке. Corning, США кат № 3599, 1 шт - 1,50 \$ за планшет. Одна лунка – 1,56 центов. 1 разведение (4	1 пробирка для гел-тромб теста дороже примерно в 12,5 раз лунки в микропланшете. Один количественный анализ для гел-тромб теста примерно в 32 раза дороже по пробиркам, чем количественный

		лунки) – 6,25 центов.	лунки) – 6,25 центов.	кинетический анализ в планшете.
--	--	--------------------------	--------------------------	------------------------------------

Таким образом, можно кратко выделить следующие основные преимущества хромогенного и турбидиметрического методов над гель-тромб тестом:

- 1) Количественные анализы, поэтому есть возможность количественной оценки степени ингибирования или усиления реакции. Оценка линейности кривой по коэффициенту корреляции. Лучшие воспроизводимость и точность, так как в гель-тромб тесте используются 2-кратные разведения.
- 2) Соответствие требованиям GMP (Документируемость. Прослеживаемость/ ретроспективность. Невозможность изменить полученные данные. Защищенность. Программное обеспечение).
- 3) Приборное обеспечение (фотометрические методы), автоматизируемость, меньше ручных операций, возможность использования многоканальных пипеток, масштабируемость, поэтому меньше затрат времени.
- 4) Объективность в оценке результатов в отличие от субъективной (визуальной) оценки гель-тромб теста.
- 5) Более высокая чувствительность (примерно в 3 раза для микропланшетного варианта) кинетических методов.
- 6) Наличие широкого рабочего диапазона, позволяющего оценить содержание в большинстве случаев даже для образцов с неизвестным содержанием эндотоксинов в одном или двух разведениях.
- 7) Более широкое применение, во-первых, из-за широкого рабочего диапазона - для оценки любых стадий производства, любых полуфабрикатов, субстанций, вспомогательных веществ, материалов, поверхности оборудования, медицинских изделий и т.д., во-вторых, из-за возможности оценки эффективности удаления эндотоксинов на стадиях технологического процесса. Инструментальные анализы более предпочтительны при использовании их во внутрипроизводственном контроле.
- 8) Возможности одновременного анализа большего количества образцов (96-луночный микропланшет), что в конечном итоге позволяет провести сравнительные исследования различных препаратов, различных методов удаления эндотоксинов в одном анализе, а значит больший потенциал к валидируемости метода.
- 9) Меньше текущих расходов по реактивам (по ЛАЛ-реактиву в 2 раза меньше для турбидиметрического анализа с реактивом Pyrostar ES-F/Plate Wako Chemicals по сравнению с гель-тромб тестом) и по посуде (микропланшеты по сравнению с

пробирками для гель-тромб теста примерно в 20 раз дешевле; минимум 4 лунки на препарат в микропланшете против минимума 10 пробирок на препарат в гель-тромб тесте).

- 10) Большая восприимчивость к мешающим факторам преодолевается за счет большего максимально допустимого разведения из-за как минимум в 1,5-3 раза более высокой чувствительности ЛАЛ реактива и/или за счет специальной пробоподготовки.
- 11) Все получаемые преимущества позволяют преодолеть единственный недостаток для кинетических методов - большие капитальные затраты на стадии закупки оборудования, программы, компьютера, тогда как текущие затраты считаются примерно одинаковыми или даже более выигрышными для турбидиметрического варианта.

Использованная литература:

- 1) Cooper J.F., J. Levin, H.N. Wagner. Quantitative comparison of *in vitro* and *in vivo* methods for the detection of endotoxin // J. Lab. Clin. Med. 1971. V. 78. P. 138–148.
- 2) Wolff S.M. Biological effects of bacterial endotoxins in man // J. Infect. Dis. 1973. V. 128s. P. 251-256.
- 3) Determination of the bacterial endotoxin in pharmaceutical raw material, finished products and water for injection (WFI) using lysate and control standard endotoxin and bacterial endotoxin test method validation. URL: <https://www.pharmaguideline.com/2011/04/bacterial-endotoxin-test-bet-validation.html#gsc.tab=0> (дата обращения 22.12.2017).
- 4) Hilderband M. Analytics in Quality control in vivo. In : Modern Biopharmaceuticals, 4 Volume Set: Design, Development and Optimization. Ed. J. Knäblein. 2005. P. 1565.
- 5) Technical Guide for the Elaboration and Use of Monographs on Human Plasma-derived Products // European Pharmacopoeia. EDQM, 2015.
- 6) Human albumin. 3.9. Pyrogen test // Minimum requirements for biological products. National institute of infectious diseases Japan. 2006. P. 217–218
- 7) Determination of the bacterial endotoxin in pharmaceutical raw material, finished products and water for injection (WFI) using lysate and control standard endotoxin and bacterial endotoxin test method validation. URL: <https://www.pharmaguideline.com/2011/04/bacterial-endotoxin-test-bet-validation.html#gsc.tab=0>
- 8) Official Control Authority Batch Release of Human Albumin. Guideline for Human Albumin. Human Blood Derived Medical Products / Council Directive 2001/83/EC formerly 89/381/EEC, amended by Directive 2004/27/EC, EDQM, 2012.
- 9) Overview of Comments Received on the Guideline on the Replacement of Rabbit Pyrogen Testing by an Alternative Test for Plasma Derived Medical Products (EMA/CHMP/BWP/452081/2007).
- 10) Human Albumin solution 01/2013:0255 // European pharmacopoeia 8.0. Chapter 0255. 2013.

- 11) Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs // Biological Products and Medical Devices. U.S. FDA. December 1987/June 2011. (Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation / Ed. by K.L. Williams. – Boca Raton: CRC Press, 2007. 440 p.
- 12) Joiner T.J., P.F. Kraus, T.C. Kupiec. Comparison of endotoxin testing methods for pharmaceutical products // International Journal of Pharmaceutical Compounding. 2002. V. 6. №. 6. P. 408–409.
- 13) Dawson M.E. Endotoxin testing. In: Pharmaceutical Dosage Forms - Parenteral Medications: Eds: Sandeep Nema, John D. Ludwig. Volume 2: facility design, sterilization and processing. 2010. P. 154.