

Валидационные процедуры для определения показателя «Бактериальные эндотоксины»

*О. В. ШАПОВАЛОВА¹, П. В. ШАДРИН¹, Н. П. НЕУГОДОВА¹, О. В. ГУНАР¹, Г. В. ДОЛГОВА²

¹ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, Москва

² ООО НБЦ «Фармбиомед», Москва

Validation Procedures for the Determination of the Indicator «Bacterial Endotoxins»

O. V. SHAPOVALOVA¹, P. V. SHADRIN¹, N. P. NEUGODOVA¹, O. V. GUNAR¹, G. V. DOLGOVA²

¹ Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² NBC «Pharmbiomed», Moscow

Применение ЛАЛ-теста, в качестве метода определения бактериальных эндотоксинов (БЭ), позволяет нормировать содержание примесей, вызывающих пирогенную реакцию у пациентов. Повышению надёжности и воспроизводимости этого метода способствуют валидационные процедуры, которые являются неотъемлемой частью методик определения БЭ и основаны на построении «модельного опыта», где сравнивают испытуемые и контрольные образцы. В зависимости от методики испытаний (гель-тромб или фотометрические тесты) на наличие БЭ применяют соответствующие валидационные процедуры с оценкой необходимых параметров. Цель данной работы — доказать с помощью валидационных процедур возможность взаимозаменяемости методов определения БЭ на примере препарата «Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 500 мг». *Методики исследования:* Гель-тромб и хромогенный кинетический тесты. *Результаты проведенных испытаний* подтверждают воспроизводимость и специфичность методик ЛАЛ-теста. Чувствительность используемого ЛАЛ-реактива подтверждена. В опытах гель-тромб теста для препарата «Цефтриаксон» валидировано разведение 1:160 основного раствора в концентрации 100 мг/мл. Параметры калибровочной кривой в кинетическом хромогенном опыте соответствовали валидационным требованиям ($CV \leq 10\%$ и $r > 0,98$). Определение содержания бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате «Цефтриаксон» фотометрическим методом возможно в том же разведении 1:160, где точность определения БЭ в испытуемом образце $CV < 20\%$, степень извлечения добавленного эндотоксина равна 108%. *Выводы.* Проведённые исследования на примере лекарственного препарата «Цефтриаксон» доказали возможность взаимозаменяемости методик определения БЭ, что подтверждено необходимыми валидационными процедурами.

Ключевые слова: бактериальные эндотоксины, ЛАЛ-(лизат амёбоцитов люмулюс)-тест, метод гель-тромб, кинетический хромогенный метод, валидация, мешающие факторы.

The use of the LAL test as a method for determining bacterial endotoxins (BE) allows us to normalize the content of impurities causing a pyrogenic reaction in patients. Increasing the reliability and reproducibility of this method is promoted by validation procedures, which are an integral part of the methods for determining BE and are based on the construction of a «model experiment» where the test and control samples are compared. Depending on the test procedure (gel-clot or photometric tests) for determining the presence of BE, appropriate validation procedures are used to assess the necessary parameters. *The purpose of the study:* to prove the possibility of interchangeability of the methods for determining BE with the help of validation procedures on the example of the drug «Ceftriaxone powder for intramuscular injection 500 mg». *Research techniques:* Gel-clot and Kinetic Chromogenic tests. The results of the conducted tests confirm the reproducibility and specificity of the LAL test methods. The sensitivity of the LAL reagent used is confirmed. In the experiments of the gel-clot test for Ceftriaxone, a dilution of 1:160 of the base solution in the concentration of 100 mg/ml was validated. The parameters of the calibration curve in the Kinetic Chromogenic test corresponded to the validation requirements ($CV \leq 10\%$ and $r > 0.98$). Determination of the bacterial endotoxin content in Ceftriaxone by the photometric method is possible at the same 1:160 dilution, where the accuracy of determination of the BE in the test sample is $< 20\%$, the degree of extraction of the added endotoxin is 108%. *Conclusions.* The conducted studies proved the possibility of interchangeability of the methods for determining the BE on the example of the Ceftriaxon drug, which is confirmed by the necessary validation procedures.

Keywords: bacterial endotoxins, LAL (lyulose amoebocyte lysate) test, gel-clot method, kinetic chromogenic method, validation, interfering factors.

Введение

«Бактериальные эндотоксины» — важнейший показатель безопасности парентеральных лекарственных средств (ЛС), обеспечивающий надле-

жащее качество препаратов. Применение ЛАЛ-теста, в качестве метода определения бактериальных эндотоксинов (БЭ) позволяет нормировать содержание примесей, вызывающих пирогенную реакцию у пациентов.

Повышению надёжности и воспроизводимости этого метода способствуют валидационные процедуры, которые являются неотъемлемой ча-

© Коллектив авторов, 2017

*Адрес для корреспонденции: 119002, Россия, г. Москва, Петровский бульвар 8, стр. 2. НЦЭСМП МЗ РФ.
E-mail: shapovalova@expmmed.ru

стью методик определения БЭ и основаны на проведении «модельного опыта», в котором сравнивают испытуемые и контрольные образцы.

Процесс валидации в ЛАЛ-тесте предусматривает проведение двух основополагающих экспериментов:

— «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива или линейности калибровочной кривой», в котором оценивается качество используемых реактивов, работы лаборатории, аналитика и условий проведения метода.

— Выявление наличия мешающих факторов испытуемого ЛС в опытах с ЛАЛ-реактивом. В данном испытании определяют степень ингибирования или потенцирования реакции для каждого испытуемого образца. Процедура актуальна на стадии разработки методики испытаний образца ЛС в неразведённом состоянии или в соответствующем рабочем разведении, но не превышающем максимально допустимое разведение (МДР) [1, 2].

Эти обязательные этапы для всех методик ЛАЛ-теста выполняют в соответствии с требованиями ОФС «Бактериальные эндотоксины» [3] и указаниями производителя, изложенными в инструкции к набору реактивов для ЛАЛ-теста.

В зависимости от методики испытаний применяют соответствующие валидационные процедуры с оценкой необходимых параметров [4].

Общими для всех шести фармакопейных методик определения БЭ являются два валидационных параметра:

Специфичность — способность метода определять БЭ с требуемым уровнем правильности и прецизионности.

Предел обнаружения — минимальная концентрация эндотоксинов в образце, которая может быть обнаружена с помощью валидируемого метода. В гель-тромб тесте предел составляет не более 0,015–0,03 ЕЭ/мл (где ЕЭ — единицы эндотоксина), тогда как в инструментальных методах (турбидиметрическом и хромогенном) — 0,01 ЕЭ/мл и 0,005 ЕЭ/мл, соответственно [5].

При выполнении гель-тромб теста обязательными предварительными анализами являются «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» и «Мешающие факторы», которые выполняют в соответствии с требованиями ОФС [3].

Критериями приемлемости для гель-тромб теста являются:

— среднее геометрическое значение чувствительности растворов стандарта эндотоксина на воде для ЛАЛ-теста в пределах двукратной вариации заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива;

— результаты отрицательного контроля воды для ЛАЛ-теста с отсутствием образования геля [6].

Для фотометрических методик, таких как турбидиметрические и хромогенные, используют специальное программное обеспечение с построением калибровочной кривой контрольных стандартов эндотоксина (КСЭ) и дополнительными показателями валидации:

— Линейность — характеризует пропорциональную зависимость времени реакции в секундах от измеряемого содержания БЭ растворов КСЭ в пределах калибровочной кривой и аналитической области выбранной методики испытания. Линейность считают доказанной, если для всех используемых в опыте растворов КСЭ абсолютное значение коэффициента линейной корреляции (r) не ниже 0,980, а значение коэффициента вариации (соотношения стандартного отклонения и среднего значения, выраженного в процентах, далее CV) не превышает 10% [7].

— Правильность — близость полученных результатов к истинному значению, которая характеризует систематическую ошибку. Её выражают в процентах восстановления БЭ и определяют как степень извлечения концентрации БЭ, внесённых в виде КСЭ в испытуемый образец ЛС. Проба положительного контроля ЛС выдерживает испытание, если процент извлечения концентрации БЭ (RSD) находится в диапазоне 50–200% от номинального значения [8, 9].

— Точность — степень близости результата измерений к принятому опорному значению. В данном случае характеризуется величиной CV характеристик калибровочной кривой и CV значений повторностей для образцов. Для отрицательного контроля испытуемого образца значение CV должно быть ≤ 10 или $\leq 25\%$ (в зависимости от требований, установленных производителем ЛАЛ-реактива). Чем ниже значения, тем ближе уровень точности между повторностями испытуемого образца [10, 11].

— Прецизионность — степень близости результатов друг к другу. Во всех опытах ЛАЛ-теста обязательна постановка испытуемых проб как минимум в двух повторностях.

В турбидиметрических и хромогенных методиках оценивают вышеуказанные параметры с использованием процедур, которые подтверждают заявленную линейность калибровочной кривой, и одновременно в этом же опыте валидируют рабочее разведение испытуемого образца. Испытание выполняют для оценки таких показателей стандартной калибровочной кривой, как r и CV , а также подтверждения или опровержения влияния испытуемого раствора ЛС на результаты испытания, то есть установления мешающих факторов [12].

Для проведения валидационных испытаний готовят растворы контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ), не менее чем в трёх концент-

рациях для получения стандартной кривой. Используют как минимум две повторности для каждой концентрации КСЭ, в соответствии с рекомендациями производителя ЛАЛ-реактива (учитывая соотношение объема проб, время инкубации, температуру, рН реакционной смеси и т. д.) [13].

Результаты испытания соответствуют требованиям если:

- содержание БЭ, полученное в отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста (отрицательный контроль), не превышает предельное значение, соответствующее чувствительности используемого ЛАЛ-реактива;

- для калибровочной кривой $CV \leq 10\%$ и $r > 0,98$;

- для испытуемого раствора образца значение $CV \leq 10\%$ или $\leq 25\%$;

- измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор образца, находится в пределах $50\% - RSD - 200\%$.

Повторную валидацию методик испытания выполняют в том случае, если:

- получены неудовлетворительные результаты опыта;

- внесены изменения в условия эксперимента, влияющие на результаты испытания [10].

Кроме того, можно рассмотреть возможность проведения повторных валидационных процедур с помощью другой методики, которая благодаря её специфическим особенностям, позволит получить более достоверные результаты. Так, например, выполнить определение БЭ не основной арбитражной методикой гель-тромб тест, а с помощью фотометрических методик, обладающих наиболее высокой чувствительностью ЛАЛ-реактива.

Цель данной работы: доказать с помощью валидационных процедур возможность взаимозаменяемости методик определения БЭ на примере препарата «Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 500 мг».

Материал и методы

Испытуемый препарат. «Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 500 мг» («Цефтриаксон»).

Методики исследования. Гель-тромб тест и хромогенный кинетический тест [3].

Реактивы. Набор реактивов для гель-тромб теста: ЛАЛ-реактив с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл (где ЕЭ — единицы эндотоксина), контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ). Набор реактивов для хромогенного кинетического теста: ЛАЛ-реактив с хромогенным субстратом, КСЭ. Вода для ЛАЛ-теста.

Используемое оборудование. Суховоздушный нагревательный прибор для инкубации при температуре 37°C, фотокориметр для микропланшетов со специальным программным обеспечением на персональном компьютере, автоматические дозаторы с переменным объемом 20—200 мкл и 100—1000 мкл, встряхиватель (вихревая мешалка), рН-метр, секундомер, штативы для пробирок.

Материалы. Наконечники для автоматических дозаторов, стеклянные круглодонные пробирки с диаметром 13 мм и 10 мм, микропланшеты 96-луночные.

Результаты и обсуждение

1. Испытания препарата «Цефтриаксон» с помощью гель-тромб теста. Непосредственно перед испытанием препарата «Цефтриаксон» осуществляли процедуру «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива» [3]. Результаты контрольного эксперимента (табл. 1) показали, что чувствительность используемого ЛАЛ-реактива не менее 0,5 λ и не более 2 λ, то есть полученная в испытании величина чувствительности ЛАЛ-реактива не отличается более чем в два раза от величины чувствительности ЛАЛ-реактива, заявленной фирмой-производителем. Это позволяет использовать данную пару (реактив и КСЭ) в дальнейших испытаниях. В отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста не наблюдалось гелеобразования реакционной смеси, что свидетельствует об отсутствии определяемого количества эндотоксина.

Затем приступали к испытанию препарата «Цефтриаксон», который разводили водой для ЛАЛ-теста для приготовления исходного раствора с концентрацией 100 мг цефтриаксона в 1 мл. Значение максимально допустимого разведения исходного раствора препарата (МДР) рассчиты-

Таблица 1. Результаты опыта «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива (λ=0,03 ЕЭ/мл)» с помощью гель-тромб теста

Параллельные пробы №	Разведения КСЭ				Контроль отрицательный (вода для ЛАЛ-теста)	Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции	Логарифм (lg) концентрации эндотоксина	
	2λ	λ	0,5 λ	0,25 λ				
	0,06 ЕЭ/мл	0,03 ЕЭ/мл	0,015 ЕЭ/мл	0,0075 ЕЭ/мл				
1	+	+	—	—	—	0,03	-1,5229	
2	+	+	—	—	—	0,03	-1,5229	
3	+	+	—	—		0,03	-1,5229	
4	+	—	—	—		0,06	-1,2219	
Сумма логарифмов концентраций эндотоксина								
-5,7906								
Сумма, разделенная на количество параллельных проб								-1,44765
Антилогарифм полученной величины — среднее геометрическое концентрации эндотоксина								0,0357 ЕЭ/мл

Примечание. Обозначение конечного результата гель-тромб теста: «+» — наличие геля, «-» — отсутствие геля.

Таблица 2. Результаты опыта «Мешающие факторы» с раствором препарата «Цефтриаксон» 100 мг/мл с помощью гель-тромб теста

Повторность №	Рабочее разведение исходного раствора препарата 1:160				Концентрация эндотоксина в конечной точке реакции эндотоксина	Среднее геометрическое значение концентрации	Отрицательный контроль	
	Разведения КСЭ						Вода для ЛАЛ-теста	Раствор препарата
	2λ	λ	0,5 λ	0,25 λ				
на воде для ЛАЛ-теста								
1	+	+	+	–	0,015 ЕЭ/мл	0,015 ЕЭ/мл		
2	+	+	+	–	0,015 ЕЭ/мл		–//–	–//–
на растворе препарата								
1	+	+	+	–	0,015 ЕЭ/мл	0,015 ЕЭ/мл	–//–	–//–
2	+	+	+	–	0,015 ЕЭ/мл		–//–	–//–
3	+	+	+	–	0,015 ЕЭ/мл		–//–	–//–
4	+	+	+	–	0,015 ЕЭ/мл		–//–	–//–

вали с учётом нормы предельного содержания БЭ (0,05 ЕЭ/мл), чувствительности используемого ЛАЛ-реактива (полное математическое значение λ = 0,03125 ЕЭ/мл) и концентрации препарата (100 мг/мл).

$$\text{МДР} = \frac{(0,05 \text{ ЕЭ/мл} \times 100 \text{ мг/мл})}{0,03125 \text{ ЕЭ/мл}} = 160$$

Величина рН реакционной смеси испытуемого раствора в разведении 1:160 составляла 6,8 и соответствовала оптимальному диапазону значений для проведения теста (рН 6–8). Результаты валидации разведения 1:160 подтвердили, что чувствительность ЛАЛ-реактива, определённая с КСЭ в разведении на воде для ЛАЛ-теста во всех опытах, отличается менее чем в два раза, от чувствительности ЛАЛ-реактива, определённой с КСЭ в разведении

на растворах образцов исследуемого препарата (табл. 2). Это означает, что испытуемый препарат в выбранном разведении, не только не ингибирует реакцию гелеобразования, но и не потенцирует её.

2) Испытания препарата «Цефтриаксон» с помощью хромогенного кинетического теста. Сначала готовили основные растворы препарата с концентрацией 100 мг/мл. Рассчитывали значение МДР с учётом нормы предельного содержания бактериальных эндотоксинов (0,05 ЕЭ/мл), чувствительности используемого ЛАЛ-реактива (λ = 0,005 ЕЭ/мл) и концентрации препарата (100 мг/мл).

$$\text{МДР} = \frac{(0,05 \text{ ЕЭ/мл} \times 100 \text{ мг/мл})}{0,005 \text{ ЕЭ/мл}} = 1000$$

Для проведения испытания готовили растворы стандартов эндотоксина с концентрацией 5 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,005 ЕЭ/мл. Параллельно с ними готовили растворы препарата «Цефтриаксон» в разведении 1:160. Концентрация положительного контроля препарата составляла 0,5 ЕЭ/мл.

Затем в компьютерную программу вводили данные об испытуемых растворах и условиях проведения теста (данные о реактивах, количество повторностей и концентрации растворов КСЭ для построения калибровочной кривой). В каждую ячейку микропланшета добавляли испытуемые рас-

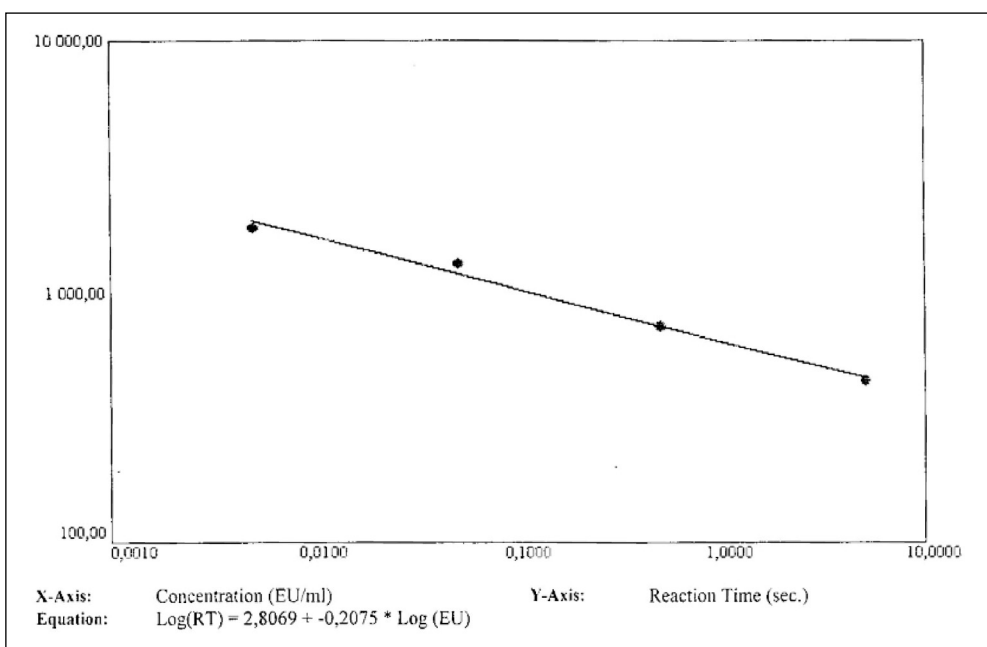


Рис. 1. Калибровочная кривая растворов стандарта эндотоксина с концентрациями 5 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,005 ЕЭ/мл (по оси ординат — время реакции; по оси абсцисс — концентрация эндотоксина, ЕЭ/мл)

Ident.	Expected Concentration	Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Standard Deviation	CV%	CV < 10%	Calculated Value
STD9	5 EU/mL	B5	450,9	445,3	5,64	1,27	PASS	>5,0000
		B6	439,7					
STD10	0,5 EU/mL	C5	737,6	739,0	1,32	0,18	PASS	0,5039
		C6	740,3					
STD11	0,05 EU/mL	D5	1316,7	1311,7	5,00	0,38	PASS	0,0317
		D6	1306,7					
STD12	0,005 EU/mL	E5	1808,6	1808,0	0,54	0,03	PASS	0,0068
		E6	1807,5					

Рис. 2. Результаты опыта «Подтверждение заявленной линейности калибровочной кривой с помощью кинетического хромогенного теста»

творы и ЛАЛ-реактив, затем устанавливали его в инкубирующее считывающее устройство фотокolorиметра. Запускали процесс считывания результатов, которые в реальном времени отображались на экране монитора компьютера.

После окончания опыта распечатывали протоколы испытаний с параметрами калибровочной кривой и результатами испытания препарата (рис. 1).

Коэффициент вариации для растворов стандарта эндотоксина всех четырёх концентраций не превышал 10%, а абсолютное значение коэффициента корреляции диапазона концентраций эндотоксина составляло 0,9940 (рис. 2), что свидетельствовало о линейности стандартной кривой.

Установлено, что содержание БЭ в препарате «Цефтриаксон» составило менее 0,2 ЕЭ/мл, при этом степень извлечения внесённого положительного контроля была 108% (рис. 3).

Результаты проведённых испытаний подтвердили воспроизводимость и специфичность методик ЛАЛ-теста.

В гель-тромб тесте среднее геометрическое концентрации эндотоксина составило $\lambda=0,0357$ ЕЭ/мл и менее чем в два раза отличалось от заявленной величины чувствительности ЛАЛ-реактива ($\lambda=0,03$ ЕЭ/мл). В отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста было зафиксировано отсутствие геля.

Параметры калибровочной кривой кинетического опыта соответствовали валидационным требованиям ($CV \leq 10\%$ и $r > 0,98$): значения коэффициента вариации для всех используемых в опыте растворов КСЭ (5 ЕЭ/мл, 0,5 ЕЭ/мл, 0,05 ЕЭ/мл, 0,005 ЕЭ/мл) составляли 1,27%, 0,18%, 0,38%, 0,03%, соответственно, а значение коэффициента корреляции $r=0,9940$. Содержание БЭ, полученное в отрицательном контроле воды для ЛАЛ-теста, не превышало предельное значение, соответствующее чувствительности используемого ЛАЛ-реактива и составило менее 0,005 ЕЭ/мл. Следовательно, полученные результаты одновременно подтвердили как пригодность реактивов и условий для проведения анализов, так и квалификацию сотрудников.

Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%	Spike Recovery %
H5	>1860,0	>1860,0	<0,2000 EU/mL	<0,2000 EU/mL	> 0,00	
H6	>1860,0		<0,2000			
Criteria Computations:						
Name:	SPL3		Spike Identifier:	SPK3		
Condition:	CV(SPL3.RTIME) < 20%		Theoretical Spike Value:	0,5		
Status:	PASS		Spike Recovery:	50 <= SPK3.RY <= 200 : PASS		
Well Layout	Reaction Time	Mean Reaction Time	Endotoxin Value	Mean Endotoxin Value	(RT) CV%	Spike Recovery %
A7	726,7	726,7	0,5464 EU/mL	0,5464 EU/mL	0,00	108
A8	726,7		0,5464			
Criteria Computations:						
Name:	SPK3					
Condition:	CV(SPK3.RTIME) < 20% AND 50 <= SPK3.RY <= 200					
Status:	PASS					

Рис. 3. Результаты опыта «Мешающие факторы» с раствором препарата «Цефтриаксон» с помощью кинетического хромогенного теста

В опытах гель-тромб теста для препарата «Цефтриаксон» валидировано разведение основного раствора 1:160 с концентрацией 100 мг/мл, которое может служить рабочим и использоваться при рутинном определении показателя «Бактериальные эндотоксины». Установлено, что для данного разведения коррекции рН не требуется.

В опытах с помощью кинетической хромогенной методики показана возможность определения содержания БЭ в препарате «Цефтриаксон» в рабочем разведении 1:160. Это подтверждено экспериментальными данными валидационного испытания: точность определения БЭ в испытуемом образце CV<20%, а степень извлечения эндотоксина, добавленного к раствору положительного контроля препарата «Цефтриаксон» составляла 108%, что укладывается в требуемый диапазон (RSD 50—200%).

Заключение

Проведённые валидационные процедуры свидетельствуют о возможности определения БЭ

в препарате «Цефтриаксон» с помощью тестов гель-тромб и кинетического хромогенного. Показано, что достоверную оценку наличия БЭ допустимо осуществлять с помощью любых вышеуказанных методик в валидованном разведении 1:160, при котором все критерии приемлемости соответствуют заявленным нормам.

Однако необходимо подчеркнуть, что данные, полученные в тесте гель-тромб, фиксировали и оценивали визуально, тогда как при использовании хромогенного кинетического теста с помощью программного обеспечения создавали протоколы испытаний, в которых отражены результаты валидационных процедур.

Таким образом, исследования, проведённые на примере лекарственного препарата «Цефтриаксон», доказали возможность взаимозаменяемости методик определения БЭ, что подтверждено необходимыми валидационными процедурами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгова Г.В., Неугодова Н.П., Шаповалова О.В., Сапожникова Г.А., Алдышева Ж.И. Определение бактериальных эндотоксинов в фармацевтических субстанциях, используемых для изготовления инфузионных растворов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2006; 2: 67—74. / Dolgova G.V., Neugodova N.P., Shapovalova O.V., Sapozhnikova G.A., Aladyшева Zh.I. Opredelenie bakterial'nykh jendotoksinov v farmaceuticheskikh substancijakh, ispol'zuemykh dlja izgotovlenija infuzionnykh rastvorov. Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija. 2006; 2: 67—74. [in Russian]
2. Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Сапожникова Г.А. Методические подходы к разработке показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2012; 3: 47—50. / Shapovalova O.V., Neugodova N.P., Dolgova G.V., Sapozhnikova G.A. Metodicheskie podkhody k razrabotke pokazatelja «Bakterial'nye jendotoksiny» v farmaceuticheskikh substancijakh. Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija. 2012; 3: 47—50. [in Russian]
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд., «Бактериальные эндотоксины» ОФС.1.2.4.0006.15. / Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii XIII izd., «Bakterial'nye jendotoksiny» OFS.1.2.4.0006.15. [in Russian]
4. 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, 1987; 54.
5. Rustichelli D., Castiglia S., Gunetti M., Mareschi K., Signorino E., Muraro M., Castello L., Sanavio F., Leone M., Ferrero I., Fagioli F. Validation of analytical methods in compliance with good manufacturing practice: a practical approach. Journal of Translational Medicine, 2013; 2—13.
6. Sandle T. Variability and Test Error with the LAL Assay. Search American Pharmaceutical Review, 2014; 17(6): 22—28.
7. Guimarães R.C., Xavier A. A. et al. Analytical Validation of LAL Kinetic Assay for Detection and Quantification of Endotoxins in Measles's Vaccine Diluents. International Journal Brazilian archives of biology and technology, 2006; Vol. 49: 59—64.
8. Richardson K., Novitsky T.J. Simple Statistics for the LAL User — Standard Deviation, Repeatability, Reproducibility and a Clarification of the Coefficient of Variation. LAL Update, 2002; Vol. 20, No. 4: 6.
9. Jonathan Wong, Nathan Davies, Hasan Jeraj, Enric Vilar, Adie Viljoen, Ken Farrington. A comparative study of blood endotoxin detection in haemodialysis patients, Journal of inflammation; 2016.
10. Syed Imtiaz Haider Validation Standard Operating Procedures: A Step by Step Guide for Achieving Compliance in the Pharmaceutical, Medical Device, and Biotech Industries, 2006; 445—965.
11. Sandle T. Performance Characteristics Of Automated LAL Tests. Pharmaceutical Microbiology Interest Group News 4, 2001; 3 — 6.
12. Hurley J.C., Tosolini F.A., Louis W.J. Quantitative Limulus lysate assay for endotoxin and the effect of plasma. J.Clin.Pathol, 1991; 44 (10): 849—854.
13. Nagarajan K., Chitnis P. K. Part II: Enhancement». BET Newsletter A Charles River Private Limited Communication, 2010; volume 1, Issue 5: 5.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Шаповалова Ольга Владимировна — Эксперт 1 категории лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Шадрин Павел Валерьевич — Эксперт 1 категории лаборатории фармакологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Неугодова Наталья Петровна — к. б. н., начальник лаборатории фармакологии Испытательного центра экспер-

тизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Гунар Ольга Викторовна — д. фарм. н., начальник лаборатории микробиологии Испытательного центра экспертизы качества ЛС Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Долгова Галина Владимировна — к. б. н., ведущий научный сотрудник ООО НБЦ «Фармбиомед», Москва