

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-115-122>

Экспериментальная оценка возможности применения ЛАЛ-теста для определения бактериальных эндотоксинов в вакцинах для профилактики бешенства

А. В. Мухачева*, О. А. Бархалева, О. В. Шаповалова, Н. П. Неугодова,
А. Ю. Бутырский, А. А. Мовсесянц, Р. А. Волкова, К. А. Саркисян

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

Резюме

Введение. На сегодняшний день наличие пирогенных примесей в готовых лекарственных формах концентрированных культуральных антирабических вакцин, производимых на территории РФ, определяют с помощью испытаний на кроликах (*in vivo*). В решении Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 151 «Об утверждении руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата» представлены требования к определению бактериальных эндотоксинов в парентеральных лекарственных препаратах. В данном документе указано, что в нормативную документацию (НД) необходимо включить метод испытания и критерий приемлемости в отношении бактериальных эндотоксинов (БЭ), применяя методику с использованием лизата амебоцитов мечехвоста. **Цель исследования.** Экспериментальная оценка возможности применения ЛАЛ-теста для определения бактериальных эндотоксинов в отечественных вакцинах для профилактики бешенства. **Материалы и методы.** Материалом служила «Вакцина антирабическая культуральная концентрированная инактивированная очищенная» отечественного производства. **Результаты и обсуждение.** С целью подтверждения воспроизводимости методики испытания методом гель-тромб теста проводили в разные временные интервалы одним и/или двумя операторами. В ходе исследования оценивалась возможность использования количественного анализа с помощью фотометрических методов. **Выводы.** Проведенное исследование продемонстрировало и экспериментально подтвердило возможность определения БЭ следующими методами: гель-тромб тест, турбидиметрический кинетический тест и хромогенный кинетический тест. Метод полуколичественного анализа с помощью гель-тромб теста рекомендуется выполнять в случае, если есть необходимость количественного анализа образцов вакцины в отсутствие возможности выполнения инструментальных методов. В ходе испытаний было установлено, что все серии образцов вакцин отечественного производства соответствовали теоретически рассчитанной и установленной норме («не более 25 ЕЭ/мл»).

Ключевые слова: ЛАЛ-тест, определение бактериальных эндотоксинов в вакцинах, испытания антирабических вакцин, гель-тромб тест, турбидиметрический кинетический тест, хромогенный кинетический тест

Конфликт интересов не заявлен.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Для цитирования: Мухачева А. В., Бархалева О. А., Шаповалова О. В. и др. Экспериментальная оценка возможности применения ЛАЛ-теста для определения бактериальных эндотоксинов в вакцинах для профилактики бешенства. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021;20(5): 115–122. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-115-122>.

Experimental Evaluation of the Possibility of using the LAL test to Determine Bacterial Endotoxins in Vaccines for Rabies Prophylaxis

AV Muhacheva**, OA Barkhaleva, OV Shapovalova, NP Neugodova, AYu Butirskiy, AA Movsesyants, RA Volkova, KA Sarkisyan
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. The presence of pyrogenic impurities in finished dosage forms of concentrated cultural anti-rabies vaccines produced in the Russian Federation is determined using pyrogenicity tests on rabbits (*in vivo*). In accordance with the decision of the Board of the Eurasian Economic Commission dated September 7, 2018 N 151 «On the approval of guidelines for drawing up a

* Для переписки: Мухачева Анастасия Вячеславовна, ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2. +7 (499) 190-18-18, +7 (495) 625-43-48, +7 (495) 625-43-42, Muhacheva@expmed.ru. ©Мухачева А. В. и др.

** For correspondence: Muhacheva Anastasia Vjacheslavovna, leading expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (499) 190-18-18, +7 (495) 625-43-48, +7 (495) 625-43-42, Muhacheva@expmed.ru. ©Muhacheva AV et al.

regulatory document on the quality of a medicinal product», one of the requirements for parenteral drugs is the determination of bacterial endotoxins. This document indicates that the regulatory documentation should include a test and an admissibility criterion for bacterial endotoxins (BE) using the horseshoe crab amoebocyte lysate technique. **Aims.** Experimental evaluation of the possibility of using the LAL-test to determine bacterial endotoxins in national vaccines for the prevention of rabies. **Materials and methods.** The research of the drug «Cultural antirabies vaccine concentrated inactivated purified» of national production was carried out in accordance with the National Pharmacopoeia of the Russian Federation, General Pharmacopoeia Monograph OFS.1.2.4.0006.15 in three modifications: gel-clot test: methods A, B; turbidimetric kinetic test: method C; chromogenic kinetic test: method D. **Results.** Was investigated 6 series of the national vaccines for the prevention of rabies from two national manufacturers (using three pharmacopoeial methods). LAL reagent produced by two companies (Charles River Endosafe® and Lonza). In order to confirm the reproducibility of the method, the gel-clot test was carried out at different time intervals by one or two operators. During the research was determined the possibility of using photometric methods (method C and D). **Conclusions.** The research proved the possibility of determining bacterial endotoxins by methods: gel-clot test (method A), turbidimetric kinetic test (method C) and chromogenic kinetic test (method D). Method B is recommended for quantitative analysis of vaccine without instrumental methods. During the research all national vaccines for the prevention of rabies was free from bacterial endotoxins (no more 25 EU/ml). **Keywords:** LAL test, bacterial endotoxins in vaccines, rabies vaccine tests, gel-clot test, turbidimetric kinetic test, chromogenic kinetic test

No conflict of interest to declare.

The work was performed within the framework of the state assignment No. 056-00005-21-00 of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Healthcare of Russia for applied scientific research (state registration number of the research 121022000147-4).

For citation: Muhacheva AV, Barkhaleva OA, Shapovalova OV, et al. Research of the possibility of using LAL-test in national vaccines for the prevention of rabies. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(5): 115–122 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-115-122>.

Введение

На сегодняшний день наличие пирогенных примесей в готовых лекарственных формах концентрированных культуральных антирабических вакцин, производимых на территории РФ, определяют с помощью испытаний на кроликах (*in vivo*). В решении Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 151 «Об утверждении руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата» представлены требования к определению бактериальных эндотоксинов (БЭ) в парентеральных лекарственных препаратах. В данном документе указано, что в нормативную документацию необходимо включить метод испытания и критерий приемлемости в отношении БЭ, применяя методику с использованием лизата амебоцитов мечехвоста (ЛАЛ-тест) [1]. В Европейской Фармакопее (ЕФ) для испытания антирабических вакцин, наряду с определением пирогенности, также предусмотрено определение БЭ. Кроме того, согласно требованиям ЕФ, испытание на пирогенность методом *in vivo* выполняется только в случаях, когда доказано наличие в субстанции других пирогенных веществ, а не только БЭ [2].

В настоящее время в готовой лекарственной форме культуральных антирабических вакцин отечественного производства проводится испытание по показателю «Пирогенность» в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ (ГФ РФ) ФС.3.3.1.0025.15 на лекарственный препарат «Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная» [3]. Испытание данного препарата по показателю «Бактериальные эндотоксины» не предусмотрено ФС.3.3.1.0025.15 [3].

Определение пирогенности методом *in vivo* является длительным и трудоемким, что связано с предварительной подготовкой животных к проведению данного теста, включающая ежедневное взвешивание и осмотр животных.

В соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0005.15 «Пирогенность», если результат, полученный на первом этапе, превышает 1,2 °C или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры более чем на 0,5 °C хотя бы у одного из трех кроликов, то необходимо перейти к проведению следующего этапа испытания. Для получения заключения о соответствии препарата по показателю «Пирогенность» повторные испытания могут проводиться до четырех раз [3].

Определение пирогенности биологическим методом *in vivo* целесообразно проводить на начальных этапах производства культуральной антирабической вакцины по многим причинам. Во-первых, для приготовления клеточной культуры используются факторы роста, содержащие бычий сывороточный альбумин, многокомпонентные ростовые и поддерживающие вирусологические питательные среды. Использование данных веществ на этапах производства вакцины в некоторых случаях может вызывать пирогенную реакцию, но они не содержат эндотоксины микробного происхождения [4]. Во-вторых, в процессе производства антирабических вакцин могут образовываться продукты жизнедеятельности клеток почек сирийских хомячков (ПСХ), так как субстрат для культивирования вируса бешенства является первичной культурой клеток ПСХ.

На последующих этапах технологического цикла производства антирабической вакцины также необходим мониторинг пирогенных примесей

в каждой серии продукта. На стадиях концентрирования, очистки, инактивации и фильтрации существует вероятность загрязнения препарата эндотоксинами бактериального происхождения.

На основании вышеописанного целесообразно определять содержание пирогенных примесей в антирабических вакцинах с помощью ЛАЛ-теста, что позволит повысить их безопасность, а также актуализировать требования к вакцинам для профилактики бешенства в соответствии с решением Коллегии Евразийской экономической комиссии.

Определение БЭ осуществляют с помощью ЛАЛ-теста (*Limulus amoebocyte lysate test*), реактив которого специфически реагирует с эндотоксином [5,6]. Преимуществами ЛАЛ-теста по сравнению с определением пирогенности *in vivo* являются: возможность полуколичественной или количественной оценки содержания БЭ в лекарственных средствах, отсутствие необходимости использования подопытных животных, надежность и быстрота исполнения, а также его высокая чувствительность и экономическая выгода [5,6].

ГФ РФ предусматривает выполнение ЛАЛ-теста с помощью 6 методов. Наиболее применяемые из них: гель-тромб тест и кинетические методы. Гель-тромб тест является арбитражным методом и выполняется в двух модификациях – А и В. Метод А подразумевает оценку качества на соответствие заявленной норме. Метод В проводят на стадии разработки методики, где валидируется оптимальное разведение раствора испытуемого образца или для определения истинного содержания БЭ в отсутствие инструментальных методов ЛАЛ-теста [6].

Наиболее высокочувствительны фотометрические методы определения БЭ – турбидиметрический кинетический тест (метод С) и хромогенный кинетический тест (метод D). В кинетических методах (С и D) фотометр измеряет оптическую плотность через фиксированные промежутки времени и определяет её изменение с меньшей погрешностью по сравнению с гель-тромб тестом. Анализ считается завершенным, когда оптическая плотность достигает наименьшего значения концентрации БЭ на калибровочной кривой [7].

Все методы достаточно надежны и воспроизводимы. При наличии необходимого оборудования и реактивов выбор остается за аналитиком. В единичных случаях применяют инструментальные методы благодаря их высокой чувствительности, позволяющей избежать влияния мешающих факторов в испытаниях ЛАЛ-теста [7].

Цель исследования – экспериментальная оценка возможности применения ЛАЛ-теста для определения бактериальных эндотоксинов в отечественных вакцинах для профилактики бешенства. Для этого сформулированы следующие задачи:

- 1) обосновать норму предельного содержания БЭ;
- 2) установить наиболее приемлемый метод определения содержания БЭ (А В, С, D);
- 3) установить оптимальные рабочие разведения образцов для определения содержания БЭ

каждым из методов в рутинном мониторинге качества продукции;

- 4) воспроизвести методики определения БЭ и выполнить валидационные исследования подходящей методики с помощью установленных параметров и критериев их оценки.

Материалы и методы

Испытуемые образцы: «Вакцина антирабическая культуральная концентрированная инактивированная очищенная», лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения отечественного производителя № 1 в количестве двух серий (образец № 1, образец № 2); «Вакцина антирабическая культуральная концентрированная инактивированная очищенная», лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения» отечественного производителя № 2 в количестве четырех серий (образец № 3, образец № 4, образец № 5, образец № 6).

Определение БЭ в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0006.15 с помощью ЛАЛ-теста в модификациях:

- гель-тромб тест: методы А, В;
- турбидиметрический кинетический тест: метод С;
- хромогенный кинетический тест: метод D.

Используемые реактивы:

- наборы реактивов: ЛАЛ-реактив с контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ) с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл и 0,015 ЕЭ/мл* (где ЕЭ – единицы эндотоксина) для методов А и В;
- набор реактивов: ЛАЛ-реактив с КСЭ для метода С с пределом обнаружения от 0,01 ЕЭ/мл*;
- набор реактивов: ЛАЛ-реактив с КСЭ для метода D с пределом обнаружения от 0,005 ЕЭ/мл*;
- вода для ЛАЛ-теста, не содержащая бактериальные эндотоксины, в комплекте с ЛАЛ-реактивом*;
- фотометр микропланшетный BIO-ТЕК ELx808 Bio-Tech, подключенный к компьютеру с программным обеспечением Endoscan-V;
- перемешивающее устройство типа Vortex;
- секундомер;
- баня водяная WNB-10;
- дозаторы автоматические переменных объемов;
- штативы для пробирок.
- микропланшеты 96-луночные плоскодонные,
- наконечники для автоматических дозаторов,
- круглодонные пробирки для разведений с диаметром 13 мм и 10 мм.

Результаты и обсуждение

Предельное содержание бактериальных эндотоксинов рассчитывали по формуле, приведенной в ГФ РФ:

$$\text{Предельное содержание эндотоксинов} = \frac{K}{M},$$

где: К – пороговая пирогенная доза, равная 5 единицам эндотоксина (ЕЭ) на 1 кг массы тела для испытуемого лекарственного препарата;

* Реактивы компаний: «Charles River Endosafe®», «Lonza».

Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

M – максимальная терапевтическая доза препарата, вводимая в течение одного часа (в мг, мл или ЕД на 1 кг массы тела) [3].

Согласно инструкции по медицинскому применению препарата содержимое ампулы с вакциной растворяют в 1 мл растворителя (вода для инъекций) в комплекте с вакциной и вводят внутримышечно взрослым (средний вес 70 кг) и детям (от 5 кг). Таким образом, с учётом пирогенной пороговой дозы (5 ЕЭ/кг), максимальной разовой дозы разведённого препарата (1 мл), наименьшим значением веса ребёнка до пяти лет (5 кг), норма предельного содержания БЭ должна составлять «не более 25 ЕЭ в 1 мл восстановленного лиофилизата».

$$\text{Предельное содержание эндотоксинов} = \frac{5 \text{ ЕЭ/кг} \times 5 \text{ кг}}{1 \text{ мл}} = 25,0 \text{ ЕЭ/мл}$$

Следует отметить, что норма с таким же значением утверждена в монографии ЕФ 9.0 на препарат: «Rabies vaccine for human use prepared in cell cultures» (07/2014:0216) [2].

Анализ испытуемых образцов с помощью ЛАЛ-теста выполнялся с учётом рассчитанной нормы. Для этого готовили исходный раствор препарата: в ампулу с лиофилизатом добавляли 1 мл воды для ЛАЛ-теста, перемешивали до полного растворения.

Качественный анализ с помощью гель-тромб теста (метод А)

Для установления соответствия рассчитанной норме предельного содержания БЭ [6] исходные растворы образцов испытывали в максимально допустимом разведении (МДР) и в кратности, соответствующей 1/2 МДР.

Определение содержания БЭ проводилось с помощью ЛАЛ-реактива чувствительностью лизата (λ) – 0,03 ЕЭ/мл и 0,015 ЕЭ/мл (полное математическое значение 0,03125 и 0,015625) одним или двумя операторами в разные временные промежутки.

$$\text{МДР антирабической вакцины} = \frac{25 \text{ ЕЭ/мл}}{0,015625 \text{ ЕЭ/мл}} = 1600$$

$$\text{МДР антирабической вакцины} = \frac{25 \text{ ЕЭ/мл}}{0,03125} = 800$$

Содержание БЭ во всех образцах соответствовали рассчитанному значению нормы предельного содержания БЭ.

Полуколичественный анализ с помощью гель-тромб теста (метод В)

При выполнении анализа с помощью гель-тромб теста исходные растворы испытывали в 10-кратных и последующих 2-кратных разведениях, не превышающих значение МДР. Для этого готовили два параллельных ряда разведений в воде для ЛАЛ-теста. Одновременно для «положительного контроля» или, как его иногда называют, «контроля ингибирования», делали два параллельных ряда таких же разведений исходного раствора препарата, но на растворе

контрольного стандартного образца эндотоксина. Концентрация эндотоксина в каждом из разведений составляла значение, в два раза превышающее чувствительность ЛАЛ-реактива (2λ) [6].

Испытания проводились как в один день (параллельно, с использованием ЛАЛ-реактива с одинаковой чувствительностью, но от разных поставщиков, или использовался ЛАЛ-реактив одного производителя, но с разной чувствительностью), так и в разные временные промежутки.

Результаты свидетельствовали об отсутствии мешающих факторов во всех исследуемых образцах. Содержание БЭ, определённое ЛАЛ-реактивом с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл, составило более 0,3 ЕЭ/мл и менее 3 ЕЭ/мл (табл. 1, 2, 4). При использовании ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,015 ЕЭ/мл, содержание БЭ находилось в пределах более 1,5 ЕЭ/мл и менее 6 ЕЭ/мл (табл. 3). Полученные данные соответствовали теоретически рассчитанной и установленной норме (не более 25 ЕЭ/мл).

Представленные в таблице 1 результаты показывают, что при пробном испытании вакцины антирабической культуральной концентрированной инактивированной очищенной, образца № 1 от 27.12.2018 нами была подтверждена возможность определения бактериальных эндотоксинов в испытуемом препарате в соответствии с требованиями ГФ РФ (контроль положительный показал наличие геля во всех разведениях, а при контроле отрицательном образования геля не наблюдалось), а также отсутствие мешающих факторов (образец препарата не ингибировал КСЭ в концентрации 2 λ (0,03125 × 2) ЕЭ/мл).

При повторном исследовании образца № 1(10.03.2020), а также образца № 2, были получены аналогичные результаты: образование геля в разведениях 1:100 и 1:200 у изучаемых образцов отсутствовало. Образование геля наблюдалось в разведении испытуемых образцов 1:10. Содержание бактериальных эндотоксинов составило более 0,3 ЕЭ/мл, но менее 3 ЕЭ/мл.

С целью оценки возможности определения БЭ в антирабической вакцине отечественного производства методом гель-тромб теста и валидации методики нами также были исследованы образцы препарата производителя № 2. Условия испытания были аналогичными (ЛАЛ-реактив производства «Charles River Endosafe®», λ = 0,03 ЕЭ/мл). Для оценки повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости методики исследование было проведено в разные временные интервалы параллельно двумя операторами. Полученные результаты исследования представлены в таблице 2.

При воспроизведении методики параллельно двумя операторами были получены аналогичные результаты: содержание БЭ составило более 0,3 ЕЭ/мл и менее 3 ЕЭ/мл, что подтвердило повторяемость и внутрилабораторную воспроизводимость получаемых результатов.

Для оценки возможности использования ЛАЛ-реактива для испытания антирабической вакцины

Таблица 1. Результаты испытания образцов № 1, 2 «Вакцина антирабическая культуральная концентрированная инактивированная очищенная» методом В

Table 1. The results of testing samples 1, 2 «Rabies vaccine cultural concentrated inactivated purified» by method B

«Вакцина антирабическая культуральная концентрированная инактивированная очищенная», образцы № 1, 2 «Rabies vaccine cultural concentrated inactivated purified», numbers of sample 1, 2								
ЛАЛ-реактив «Charles River Endosafe®», λ = 0,03 ЕЭ/мл, 1 оператор LAL-reagent «Charles River Endosafe®», λ = 0,03EU/ml, 1 operator								
Дата проведения испытания Date of testing	№ образца Numbers of samples	Содержание бактериальных эндотоксинов, ЕЭ/мл Quantity of bacterial endotoxins, EU/ml	Фактор разведения Dilution factor			Контроли Standards		
			1:10	1:100	1:200	Положительный positive	Отрицательный negative	Положительный контроль испытуемого препарата 2λ (0,03125 × 2) ЕЭ/мл positive standard of samples 2λ (0,03125 × 2) EU/ml
27.12.2018	Образец № 1 Sample No. 1	> 0.3; < 3	+	-	-	++	--	+
10.03.2020	Образец № 1 Sample No. 1	> 0.3; < 3	+	-	-	++	--	+
10.03.2020	Образец № 2 Sample No. 2	> 0.3; < 3	+	-	-	++	--	+

Примечание: Обозначение конечного результата гель-тромб теста: + наличие геля, — отсутствие геля.
Note: Designation of the final results of the gel-clot test: + gel formed, — no gel formed.

Таблица 2. Результаты испытаний образцов производителя № 2 вакцины антирабической культуральной концентрированной инактивированной очищенной методом В с ЛАЛ-реактивом «Charles River Endosafe®», λ = 0,03 ЕЭ/мл (2 оператора)

Table 2. The results of testing samples «Rabies vaccine cultural concentrated inactivated purified» from manufacturing No 2 by method B with LAL-reagent «Charles River Endosafe®», λ = 0,03 EU/ml (2 operators)

№ образца Numbers of samples	Содержание БЭ в образцах, (более или менее, ЕЭ/мл) Quantity of bacterial endotoxins on the samples, (more or less, EU/ml)		
	Опыт от 10.10.2019 Experiment from 10.10.2019	Опыт от 14.02.2020 Experiment from 14.02.2020	Опыт от 18.02.2020 Experiment from 18.02.2020
Образец № 3 Sample No. 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3
Образец № 4 Sample No. 4	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3
Образец № 5 Sample No. 5	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3
Образец № 6 Sample No. 6	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3

методом гель-тромб теста и подтверждения ранее полученных результатов аналогичные образцы препарата (образцы № 3, 4, 5, 6) были испытаны по показателю «Бактериальные эндотоксины» с использованием ЛАЛ-реактива другой чувствительности (ЛАЛ-реактив производства «Charles River Endosafe®», λ = 0,015 ЕЭ/мл. Полученные результаты исследования представлены в таблице 3.

На основании проведенного исследования с использованием ЛАЛ-реактива с другой чувствительностью (λ = 0,015 ЕЭ/мл) были получены результаты, находящиеся в пределах обнаружения данного ЛАЛ-реактива, выявленный диапазон укладывался в установленную норму (не более 25 ЕЭ/мл).

С целью изучения возможности воспроизведения методики с использованием ЛАЛ-реактива различных производителей и сравнительной оценки получаемых результатов нами был использован ЛАЛ-реактив производства фирмы «LONZA» с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл. Данные представлены в таблице 4.

Полученные данные подтвердили возможность использования ЛАЛ-реактива производства фирмы «LONZA». Содержание БЭ составило более 0,3 ЕЭ/мл и менее 3 ЕЭ/мл, что подтвердило сходимость результатов при использовании ЛАЛ-реактива другого производителя.

Полученные результаты (см. табл. 1–4) позволяют рекомендовать выполнение гель-тромб теста с ЛАЛ-реактивом (0,015– 0,03 ЕЭ/мл) в разведениях начиная с кратности 1:100.

Таблица 3. Результаты испытаний образцов производителя № 2 вакцины антирабической культуральной концентрированной инактивированной очищенной методом В с ЛАЛ-реактивом «Charles River Endosafe®», λ = 0,015 ЕЭ/мл (2 оператора)

Table 3. The results of testing samples «Rabies vaccine cultural concentrated inactivated purified» from manufacturing No 2 by method B with LAL-reagent «Charles River Endosafe®», λ = 0,015 EU/ml (2 operators)

№ образца Numbers of samples	Содержание БЭ в образцах, (более или менее, ЕЭ/мл) Quantity of bacterial endotoxins on the samples, (more or less, EU/ml)		
	Опыт от 09.10.2019 Experiment from 09.10.2019	Опыт от 10.10.2019 Experiment from 10.10.2019	Опыт от 25.02.2020 Experiment from 25.02.2020
Образец № 3 Sample No. 3	> 1.5; < 3	> 1.5; < 3	> 1.5; < 3
Образец № 4 Sample No. 4	> 3; < 6	> 1.5; < 3	> 1.5; < 3
Образец № 5 Sample No. 5	> 3; < 6	> 1.5; < 3	> 1.5; < 3
Образец № 6 Sample No. 6	> 1.5; < 3	> 1.5; < 3	> 1.5; < 3

Количественный анализ с помощью фотометрических методов (методы С и D)

Фотометрические кинетические методы определения БЭ выполняли в соответствии с указаниями инструкции компании-производителя набора реактивов и программного обеспечения Endoscan-V.

Из раствора с КСЭ готовили растворы, необходимые для построения калибровочной кривой, состоящей не менее чем из 4 точек, соответствующих четырем концентрациям.

Испытуемый образец вакцины № 1 разводили водой для ЛАЛ-теста до кратности разведения 1:50. Одновременно готовили растворы образца с добавлением эндотоксина (так называемая величина РРС – «Product Positiv Control»/«положительный контроль препарата») для подтверждения отсутствия мешающих факторов. Концентрация эндотоксина в этом растворе приблизительно соответствовала середине стандартной кривой. Исследуемые концентрации для построения стандартных кривых при турбидиметрическом кинетическом и хромогенном кинетическом тестах представлены в таблице 5.

Таким образом, конечная концентрация эндотоксина составила в положительном контроле

препарата при методе С – 1 ЕЭ/мл, при методе D – 0,5 ЕЭ/мл.

Для выполнения исследования указанными методами в ячейки микропланшета с помощью автоматического дозатора помещали все испытуемые растворы по 100 мкл в каждую лунку микропланшета. Далее добавляли ЛАЛ-реактив в ячейки с растворами и начинали считывание результатов анализа на фотометре.

Обнаружено, что испытуемый раствор не обладает мешающими факторами в разведении 1:50, так как измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор, соответствовала диапазону 50–200% от известной концентрации добавленного эндотоксина (табл. 6, 7).

Достоверную оценку наличия БЭ в вакцинах для профилактики от бешенства возможно и допустимо осуществлять с помощью фотометрических кинетических тестов. Рекомендуемое разведение для рутинного мониторинга – 1:50.

Выводы

1. Экспериментально доказана возможность определения БЭ в вакцине антирабической

Таблица 4. Результаты испытаний образцов отечественного производителя № 2 вакцины антирабической культуральной концентрированной инактивированной очищенной методом В с ЛАЛ-реактивом «LONZA», λ = 0,03 ЕЭ/мл (2 оператора)

Table 4. The results of testing samples «Rabies vaccine cultural concentrated inactivated purified» from manufacturing No 2 by method B with LAL-reagent «LONZA», λ = 0,03 EU/ml (2 operators)

№ образца Numbers of samples	Содержание БЭ в образцах, (более или менее, ЕЭ/мл) Quantity of bacterial endotoxins on the samples, (more or less, EU/ml)		
	Опыт от 14.02.2020 Experiment from 14.02.2020	Опыт от 19.02.2020 Experiment from 19.02.2020	Опыт от 27.02.2020 Experiment from 27.02.2020
Образец № 3 Sample No. 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3
Образец № 4 Sample No. 4	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3
Образец № 5 Sample No. 5	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3
Образец № 6 Sample No. 6	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3	> 0.3; < 3

Таблица 5. Концентрации растворов контрольного стандартного образца эндотоксина, используемые в испытаниях фотометрических кинетических методов

Table 5. Concentrations of solutions Control Standard Endotoxins (CSE) in photometric kinetics tests

Метод определения Method of determination	Концентрации растворов КСЭ, (ЕЭ/мл) Concentration of solutions CSE (EU/ml)	
	для построения калибровочной кривой results for calibration diagram	для положительного контроля лекарственного препарата for positive standard of samples medicinal product
Турбидиметрический кинетический тест метод С Turbidimetric kinetics test method C	10 1 0,1 0,01	10
Хромогенный кинетический тест метод D Chromogenic kinetics test Method D	5 0,5 0,05 0,005	5

- следующими методами: гель-тромб тест (метод А), турбидиметрический кинетический тест (метод С) и хромогенный кинетический тест (метод D). Метод В рекомендуется использовать в случае, если есть необходимость количественного анализа образцов вакцины в отсутствие возможности использования инструментальных методов.
2. Определена и обоснована норма предельного содержания БЭ в антирабических вакцинах отечественного производства. Норма выражена в ЕЭ на мл восстановленного раствора с учётом того, что содержимое препарата растворяют в 1 мл воды для ЛАЛ-теста.
 3. В ходе испытаний было установлено, что все серии образцов вакцин отечественного производства соответствовали теоретически рассчитанной и установленной норме («не более 25 ЕЭ/мл»).
 4. В опытах гель-тромб теста в разведении восстановленного раствора вакцины кратностью 1:100 мешающие факторы не обнаружены, однако в разведении 1:10 при использовании ЛАЛ-реактива с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл был отмечен плотный гель, что свидетельствовало о наличии БЭ в образцах (более 0,3 ЕЭ/мл, но менее 3,0 ЕЭ/мл). При постановке двумя операторами были получены сопоставимые результаты.

5. Фотометрическими методами определено содержание БЭ в образце № 1, которое составило 1,9 ЕЭ/мл (методом С), 1,5 ЕЭ/мл (метод D). Полученные величины не противоречат результатам гель-тромб теста – менее 3 ЕЭ/мл, но более 0,3 ЕЭ/мл.
 6. Установлены разведения для выполнения рутинных анализов. Показано, что с использованием ЛАЛ-реактива с высокой чувствительностью/пределом обнаружения $\lambda = 0,005-0,015$ допускается определение БЭ начиная с разведения 1:50.
 7. Валидационные исследования свидетельствовали о пригодности методик определения БЭ в антирабических вакцинах. Фотометрическими тестами установлено, что критерий правильности, определяющий степень извлечения внесённой концентрации БЭ в положительном контроле, находился в пределах от 50 до 200%. Абсолютное значение коэффициента корреляции диапазона концентраций БЭ составляло $R > 0,98$, что свидетельствовало о линейности результатов методики.
- На основании полученных результатов исследования рекомендовано внести показатель «Бактериальные эндотоксины» в ГФ РФ ФС ФС.3.3.1.0025.15 «Вакцина антирабическая

Таблица 6. Результаты испытания образца № 1 вакцины антирабической культуральной концентрированной инактивированной, очищенной методом С

Table 6. The results of testing sample No. 1 of «Rabies vaccine cultural concentrated inactivated purified» by method C

Критерии испытания Tests criterion	Норма Standard	Результаты The results
Коэффициент корреляции калибровочной кривой Correlation coefficient of calibration diagram	$\geq 0,980$	0,9972
Отрицательный контроль воды для ЛАЛ-теста Negative standard of water for LAL-test	$< 0,01$ ЕЭ/мл $< 0,01$ EU/ml	$< 0,01$ ЕЭ/мл $< 0,01$ EU/ml
Степень извлечения эндотоксина Spike recovery	В положительном контроле образца (50 – 200) % On positive standard of samples (50 – 200) %	130 % 130 %
Содержание БЭ в исходном растворе образца Quantity of bacterial endotoxins on the solution of initial sample	Не более 25 ЕЭ/мл No more than 25 EU/ml	1,9015 ЕЭ/мл 1,9015 EU/ml

Таблица 7. Результаты испытания образца № 1 вакцины антирабической культуральной концентрированной инактивированной, очищенной методом D
Table 7. The results of testing sample No. 1 of «Rabies vaccine cultural concentrated inactivated purified» by method D

Критерии испытания Tests criterion	Норма Standard	Результаты The results
Коэффициент корреляции калибровочной кривой Correlation coefficient of calibration diagram	≥ 0,980	0,9996
Отрицательный контроль воды для ЛАЛ-теста Negative standard of water for LAL-test	< 0,005 ЕЭ/мл < 0,005 EU/ml	< 0,005 ЕЭ/мл < 0,005 EU/ml
Степень извлечения эндотоксина Spike recovery	В положительном контроле образца (50 – 200) % On positive standard of samples (50 – 200) %	107 % 107 %
Содержание БЭ в исходном растворе образца Quantity of bacterial endotoxins on the solution of initial sample	Не более 25 ЕЭ/мл No more than 25 EU/ml	1,5935 ЕЭ/мл 1,5935 EU/ml

культуральная концентрированная очищенная «Не более 25 ЕЭ/мл восстановленного раствора.
инактивированная». Раздел дать в редакции: Препарат растворяют в 1 мл воды для БЭТ».

Литература

1. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 7 сентября 2018 г. № 151 «Об утверждении руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата. Приложение № 1 к Руководству по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата. Лекарственные препараты для парентерального применения, п. 42. Доступно на: <https://www.alta.ru/tamdoc/18kr0151/>. Ссылка активна на 01.02.2021.
2. Европейская Фармакопея, 9 издание, 2017 г.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Доступно на: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Ссылка активна на 01.02.2021.
4. Kevin L. Williams. Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation (Drugs and the Pharmaceutical Sciences Book 167) 3rd Edition. Eli Lilly & Company Indianapolis, Indiana, U.S.A. Chapter 7. Nonendotoxin Microbial Pyrogens: Lesser Endotoxins and Superantigens p.133.
5. Шаповалова О. В., Неугодова Н. П., Рябцева М. С., Агаширинова А. А., Гунар О. В. Альтернативные биологические методы оценки качества лекарственных средств. Фармация. 2017; 2: 7–10. DOI: <https://doi.org/None>. Доступно на: <https://pharmacijajournal.ru/ru/25419218-2017-02-02>. Ссылка активна на 01.02.2021.
6. Шаповалова О. В. «Разработка методических подходов для определения содержания бактериальных эндотоксинов в фармацевтических субстанциях» Автореферат дис. канд. фармацевтических наук: 14.04.02, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва 2018; Доступно на: <https://www.dissercat.com/content/razrabotka-metodicheskikh-podkhodov-dlya-opredeleniya-soderzhaniya-bakterialnykh-endotoksino/read>. Ссылка активна на 01.02.2021.
7. Шаповалова О. В., Неугодова Н. П., Сапожникова Г. А. Выбор метода определения бактериальных эндотоксинов. Антибиотики и химиотерапия. 2018; 63(5-6):43–45. Scopus EID: 2-s2.0-85055337352. Доступно на: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85055337352&origin=inward&txGid=7e204826f26ade5a846bfc4b655a399> Ссылка активна на 28.09.2021.

References

1. Board of the Eurasian Economic Commission dated September 7, 2018 N 151 « On the approval of guidelines for drawing up a regulatory document on the quality of a medicinal product » «. Available at: <https://www.alta.ru/tamdoc/18kr0151/>. Accessed: 01.02.2021.
2. European Pharmacopoeia 9th Edition.
3. Pharmacopoeia of the Russian Federation. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Accessed: 01.02.2021.
4. Kevin L. Williams. Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation (Drugs and the Pharmaceutical Sciences Book 167) 3rd Edition. Eli Lilly & Company Indianapolis, Indiana, U.S.A. Chapter 7. Nonendotoxin Microbial Pyrogens: Lesser Endotoxins and Superantigens p.133.
5. Shapovalova O.V., Neugodova N.P., Ryabtseva M.S., et al. Alternative biological methods for assessing the quality of medicines. Farmaciya; 2017; 2: 7–10 (In Russ). DOI: <https://doi.org/None>. Available at: <https://pharmacijajournal.ru/ru/25419218-2017-02-02>. Accessed: 01.02.2021.
6. Shapovalova O.V. Development of methodological approaches for determining the content of bacterial endotoxins in pharmaceutical substances [dissertation]. Moscow; 2018 (In Russ). Available at: <https://www.dissercat.com/content/razrabotka-metodicheskikh-podkhodov-dlya-opredeleniya-soderzhaniya-bakterialnykh-endotoksino/read>. Accessed: 01.02.2021.
7. Shapovalova O.V., Neugodova N.P., Sapozhnikova G.A. Choosing Bacterial Endotoxin Detection Method. Antibiotiki i khimioterapiya. 2018; 63 (5-6): 43–45. (In Russ). Scopus EID: 2-s2.0-85055337352. Available at: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85055337352&origin=inward&txGid=7e204826f26ade5a846bfc4b655a399> Accessed: 28.09.2021.

Об авторах

- **Анастасия Вячеславовна Мухачева** – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (499) 190-18-18, доб. 6549, Muhacheva@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>.
- **Оксана Александровна Бархалева** – главный эксперт лаборатории вирусных вакцин, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (499) 190-18-18, доб. 6540, Barhaleva@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2397-8154>.
- **Ольга Владимировна Шаповалова** – ведущий эксперт лаборатории фармакологии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (495) 625-43-48, доб. 6481, Shapovalova@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>.
- **Наталья Петровна Неугодова** – начальник лаборатории фармакологии, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (499) 190-18-18, доб. 6485, Neugodova@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>.
- **Алексей Юрьевич Бутырский** – главный эксперт лаборатории вирусных вакцин, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (499) 190-18-18, доб. 6548, Butirskiy@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>.
- **Артасеш Авакович Мовсесянц** – начальник испытательного центра экспертизы качества МИБП, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (499) 190-18-18, доб. 6506, Movsesyants@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>.
- **Рауза Асхатовна Волкова** – начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (499) 190-18-18, доб. 6527, Volkova@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>.
- **Каринэ Артасешовна Саркисян** – начальник лаборатории вирусных вакцин, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. +7 (499) 190-18-18, доб. 6547, Sarkisyan@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>.

Поступила: 21.05.2021. **Принята к печати:** 01.10.2021
 Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Anastasija V. Muhacheva** – Leading expert of the viral vaccine laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (499) 190-18-18, add. 6549, Muhacheva@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>.
- **Oksana A. Barhaleva** – Main expert of the viral vaccine laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (499) 190-18-18, add. 6540, Barhaleva@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2397-8154>.
- **Ol'ga V. Shapovalova** – Leading expert of the Pharmacology Laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (495) 625-43-48, add. 6481, Shapovalova@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>.
- **Natalija P. Neugodova** – Chief of the Pharmacology Laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (495) 625-43-48, add. 6485, Neugodova@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>.
- **Aleksej Ju. Butyrskij** – Main expert of the viral vaccine laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (499) 190-18-18, add. 6548, Butirskiy@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>.
- **Artashes A. Movsesjanc** – Chief of the Testing Center for Evaluation of MIBP Quality, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (499) 190-18-18, add. 6506, Movsesyants@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>.
- **Rauza A. Volkova** – Chief of the laboratory for molecular biological and genetic testing methods, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (499) 190-18-18, add. 6527, Volkova@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>.
- **Karinje A. Sarkisjan** – Chief of the viral vaccine laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. +7 (499) 190-18-18, add. 6547, Sarkisyan@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>.

Received: 21.05.2021 **Accepted:** 01.10.2021
 Creative Commons Attribution CC BY 4.0.