

РЕЗУЛЬТАТЫ 14 РАУНДА ПРОГРАММЫ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ЛАБОРАТОРИЙ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛС

ИСПЫТАНИЕ ТЕСТОВОГО ОБРАЗЦА НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ ГЕЛЬ-ТРОМБ МЕТОДОМ

**МЕРКУЛОВА ЮЛИЯ, К. БИОЛ. НАУК,
ВЕДУЩИЙ НАУЧНЫЙ СОТРУДНИК,
ТЕЛ. +38 (057) 3151342
YUMERKULOVA@UKR.NET
WWW.SPBU.ORG**

15 мая 2018, г. Киев

ЦЕЛЬ ТЕСТИРОВАНИЯ

- обеспечение получения достоверных результатов при проведении испытания *Бактериальные эндотоксины*
- предоставление участникам необходимой информации для выявления проблем и усовершенствования их работы при контроле пирогенности лекарственных средств и изделий медицинского назначения

ЗАДАЧИ ТЕСТИРОВАНИЯ

- провести испытание образца в соответствии с требованиями общей статьи ГФУ/ЕФ 2.6.14, «Бактериальные эндотоксины», метод А - гелл-тромб метод: предельное испытание
- представить результаты испытания путем заполнения формы Протокола (*Форма РЗ-У/ППТ 14*)

МЕТОД ИСПЫТАНИЯ

- метод А - гель-тромб метод: предельное испытание
- испытание проводится в соответствии с требованиями общей статьи ГФУ/ЕФ 2.6.14., «Бактериальные эндотоксины» и рекомендаций, изложенных в ГФУ/ЕФ 5.1.10. «Рекомендации по применению испытания на бактериальные эндотоксины»

ТЕСТОВЫЕ ОБРАЗЦЫ

- В качестве ТО для проведения тестирования по данному показателю был аттестован раствор лекарственного средства
- Аттестация ТО по показателю «Бактериальные эндотоксины» проведена 2 компендиальными методами, описанными в ГФУ/ЕФ 2.6.14, «Бактериальные эндотоксины»:
 - основным (базовым) методом
метод А - гель-тромб метод: предельное испытание;
 - инструментальным фотометрическим методом
метод С - турбидиметрический кинетический метод.
- В результате аттестации показано, что ТО **соответствует требованиям** испытания по показателю «Бактериальные эндотоксины».

КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Поскольку конечным результатом при испытании ТО является заключение лаборатории о его соответствии или не соответствии требованиям установленного уровня регламентации по показателю «Бактериальные эндотоксины», формальным критерием оценивания результатов тестирования была правильность сделанного участниками заключения.

- **Участники, чьи выводы о соответствии/не соответствии ТО требованиям испытания согласуются с выводом, полученным при аттестации ТО, считаются получившими удовлетворительный результат тестирования.**
- **Участники, чьи выводы о соответствии/не соответствии ТО требованиям испытания не согласуются с выводом, полученным при аттестации ТО, считаются получившими неудовлетворительный результаты тестирования.**

КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

- Тестовое задание включало также представление данных предварительного испытания, выполняемого в соответствии с требованиями раздела ГФУ/ЕФ 2.6.14., 1.(i) *Подтверждение заявленной на этикетке чувствительности лизата*.
- Целью этого задания являлось представление участниками информации об условиях валидации испытания и возможных причинах снижения достоверности его результатов.
- Результаты выполнения испытания *Подтверждение заявленной на этикетке чувствительности лизата* не оказывали влияние на принятие решения о результатах тестирования по основному критерию.

КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

- При проведении тестирования оценивали также соответствие требованиям общей статьи ГФУ/ЕФ 2.6.14, «Бактериальные эндотоксины» и рекомендациям, изложенным в соответствующих разделах 5.1.10. «Рекомендации по применению испытания на бактериальные эндотоксины» следующих этапов испытания:
 - процедура пробоподготовки ТО, включая *(в случае необходимости)* способ устранения мешающих факторов
 - расчет МДР и определение коэффициента разведения испытуемого раствора
 - приготовление реактивов и стандарта *(раствора лизата и серии разведений основного раствора стандартного препарата эндотоксина)*

КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

- Оценивали соблюдение участниками требований общей статьи ГФУ/ЕФ 2.6.14, «Бактериальные эндотоксины», рекомендаций производителя используемого лизата амебоцитов и выполнение правил принятой лабораторной практики относительно:
 - условий проведения испытания, таких как соблюдение и подтверждение требуемого температурного режима инкубирования проб в инкубационном блоке;
 - использование соответствующих выбранной процедуре дозаторов;
 - наличие метрологической поверки и квалификации оборудования;
 - использование реактивов, материалов и оборудования надлежащего качества

РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

В тестировании по показателю «Бактериальные эндотоксины» приняло участие 23 лаборатории, среди них:

- 15 лабораторий/отделов контроля качества фармацевтических предприятий Украины
- 5 лабораторий других организаций Украины, которые осуществляют контроль качества лекарственных средств
- 3 лаборатории контроля качества лекарственных средств из стран ближнего зарубежья

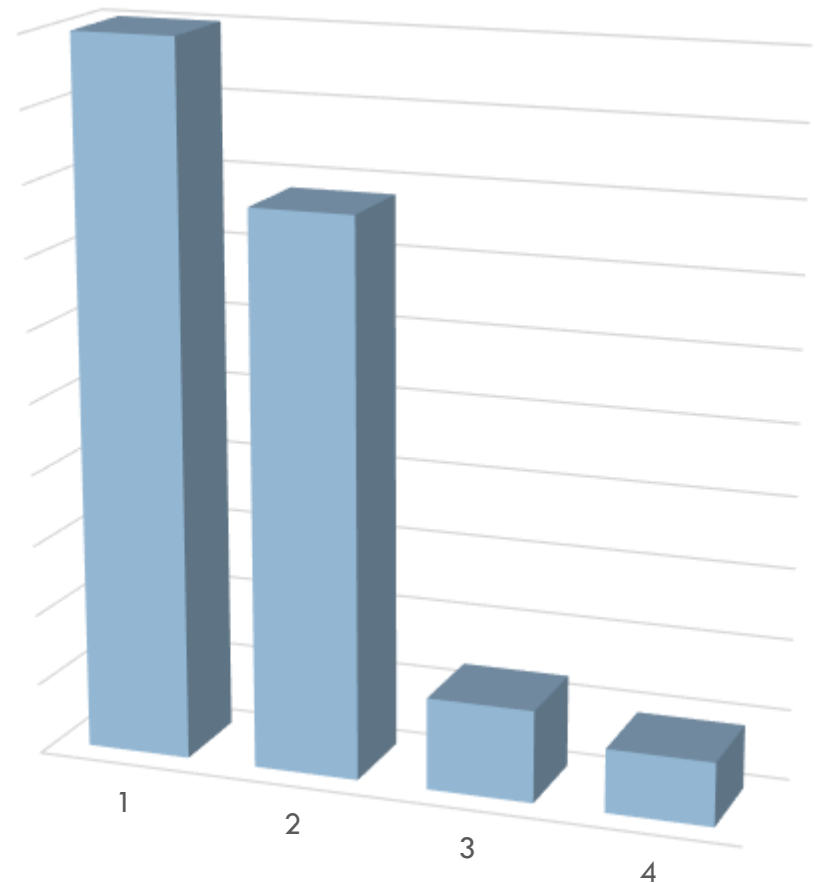
РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

- 23 лаборатории получили результат, совпадающий с результатом, полученным при аттестации ТО, и, правильно интерпретировав результаты контроля, проведенного гел-тромб методом (метод А), сделали заключение о соответствии ТО требованиям испытания по показателю «Бактериальные эндотоксины», что согласуется с выводом, полученным при аттестации ТО
- 23 участника, согласно оцениванию результатов тестирования ТО по формальному критерия, считаются получившими **удовлетворительный результат тестирования**

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Метрологическая поверка и квалификация инкубационного блока

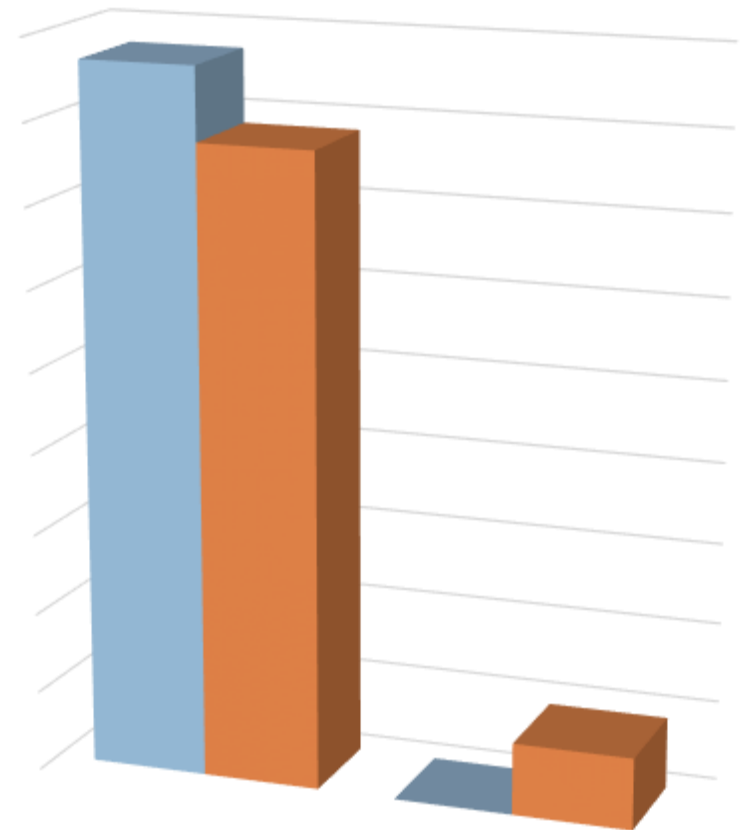
- Все (100 %) участники тестирования использовали в качестве инкубационного блока соответствующее условиям испытания $/(37\pm 1)^\circ\text{C}/$ оборудование (*водяная баня без принудительной циркуляции, суховоздушная баня, твердотельный термостат*)
- 78 % участников (18 из 23) указали *неопределенность* измерения температуры в инкубационном блоке, заявленную производителем (*min $\pm 0.1^\circ\text{C}$, max $\pm 1^\circ\text{C}$*).
- 13 % участников (код 21, 23 и 27) ошибочно внесли данные о рабочем температурном диапазоне инкубационного блока и в Протоколах 9 % участников (код 6 и 26) данная метрологическая характеристика отсутствовала



ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Метрологическая поверка и квалификация инкубационного блока

- 87 % участников (20 из 23) представили данные о метрологической поверке инкубационного блока, из них 18 (78 %) проводили также квалификацию в эксплуатации
- 9 % участников (3 из 23) не проводили метрологическую поверку, но подтверждали надежность температурных параметров инкубационного блока результатами квалификации эксплуатации (PQ)
- 2 участника (код 11 и 40) предусмотрели и провели тесты PQ в текущем, 2018 году; участники (код 25 и 40) указали установленную в лаборатории периодичность квалификации в эксплуатации
- Только 1 участник (код 38) использовал термометры с истекшим сроком метрологической поверки



ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Метрологическая поверка и квалификация оборудования

- Все (100 %) участники тестирования использовали инкубационный блок, требуемые температурные параметры которого были подтверждены, хотя и с различным уровнем надежности.
- Все (100%) участники тестирования предоставили данные о *метрологической поверке и/или квалификации эксплуатации* холодильной камеры, из них 74 % - проводили как метрологическую экспертизу, так и тест PQ

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Дозаторы, наконечники, пробирки

- Предоставленная участниками информация (Форма РЗ-У/ППТ 14) **не позволила сделать однозначного вывода о соответствии** используемых ими **дозаторов** задачам данного испытания
- Все 23 участника использовали **наконечники** для дозаторов и **пробирки** **должного качества**, «отсутствие эндотоксинов» в которых было подтверждено сертификатом производителя
- Участники тестирования под кодом 3, 5, 6, 12, 20, 22, 25, 26 и 39 в Протоколе отметили, что отсутствие эндотоксинов в используемых материалах (пробирки, наконечники) подтверждает и сертификат производителя, и «отрицательный результат в отрицательном контроле», что является безусловным свидетельством методологически грамотной интерпретации результатов испытания

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Оборудование и материалы

- Участники (код 3, 5, 9-11, 16, 21, 23, 30, 32, 36, 38-40) указали **средства определения рН**, что, учитывая требование ГФУ/ЕФ 2.6.14. к допустимому интервалу рН и отсутствие верифицированной методики испытания, было **необходимым и обязательным**
- Участники (код 3, 5, 30, 32, 36, 39 и 40) использовали **секундомер/таймер**, тем самым, обеспечивая надежность выполнения временных параметров, предусмотренных процедурой испытания
- Некоторые участники включили в перечень пленку Parafilm[®], необходимость которой продиктована требованием общей статьи ГФУ/ЕФ 2.6.14. о «...методике, позволяющей избежать загрязнения эндотоксинами...»

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Реактивы

Большинство лабораторий при приготовлении раствора лизата, основного раствора стандартного препарата эндотоксина и серии его разведений **следовали рекомендациям производителя**, как того требует общая статья ГФУ/ЕФ 2.6.14. и 5.1.10.

При подготовке разведений основного раствора стандартного препарата эндотоксина (код 2, 11, 23 и 32) избраны объемы смешиваемых растворов, которые могут несколько увеличивать *неопределенность* результатов

пробірки/розчин (розведення)	Об'єм води для БЕТ, мл	№ ²	Об'єм розчину СПЕ, мл	№ ²	Концентрація, МО/мл (λ)
1	0,986	№1	0,014	№2	20
2	0,938	№1	0,063	№2	1,25

и, хотя, информация производителя стандартного препарата эндотоксина о коэффициентах его разведения, носит исключительно рекомендательный характер, но была получена на основании длительных исследований по стандартизации методики при максимально полном извлечении эндотоксина, и, безусловно, должна быть учтена

Участник (код 32) при приготовлении серии разведений основного стандартного препарата эндотоксина использовал буферный раствор вместо разбавителя, указанного производителем стандарта, - воды для БЕТ (возможно, *техническая опечатка*).

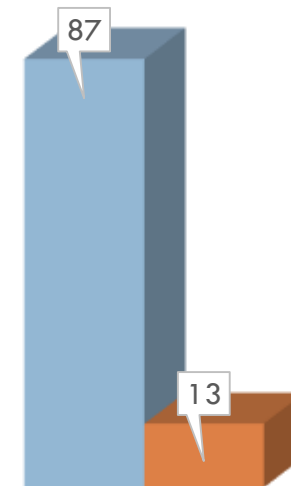
ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Подтверждение заявленной на этикетке чувствительности лизата

87 % участников (20 из 23) выполнили подтверждение заявленной на этикетке чувствительности лизата **в полном соответствии с требованиями общей статьи ГФУ/ЕФ 2.6.14, «Бактериальные эндотоксины»**

Участник (код 2) использовал более высокие, чем 2λ, λ, 0.5λ и 0.25 λ, концентрации, что ставит под сомнение результаты валидации испытания

Участник (код 26) получил «стойкий гель» в ряду пробирок, с концентрацией стандартного препарата эндотоксина 0.25 λ и, следовательно, не выполнил условия валидации испытания (возможно, *техническая опечатка, т.к. не подтверждено дальнейшими расчетами*)



ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Пробоподготовка испытуемого образца

- Величина **Максимально допустимого разведения (МДР)** - ограничивает степень разведения испытуемого образца, тем самым, обеспечивая надежность контроля пирогенов
- Участники указали различную величину МДР в зависимости от избранной методологии расчета.
- 39 % участников определили МДР, исходя из чувствительности лизата (λ) 0.03 МЕ/мл и указали величину МДР - **33,33** или **33**.

$$\text{МДР} = \text{ПЭ} / \lambda = 1 \text{ МЕ/мл} : 0.03 \text{ МЕ/мл} = 33.33$$

- В 57 % лабораториях (код 4, 5, 6, 12, 16, 25, 26, 38, 39 и 40) применили в формуле величину λ равную 0.03125 МЕ/мл и получили величину **32**

$$\text{МДР} = \text{ПЭ} / \lambda = 1 \text{ МЕ/мл} : 0.03125 \text{ МЕ/мл} = 32$$

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Пробоподготовка испытуемого образца

- С позиции фармакопейных требований и инструкции производителей лизата все полученные значения МДР могут быть использованы по следующим причинам:
 - на флаконе чувствительность лизата заявлена 0.03 МЕ/мл в действительности составляет 0.03125 МЕ/мл, т.к. определяется при 2-кратных разведениях эндотоксина
(1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, **0.03125**, 0.016, 0.08 МЕ/мл)

Response Characteristics:	Endotoxin Concentration (EU/mL)					
	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125

- производители лизата полагают, что, учитывая 2-кратную ошибку метода, допустимо на этикетке округлить заявленную чувствительность лизата до второго знака после запятой

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Пробоподготовка испытуемого образца

- Вместе с тем, согласно рекомендациям наиболее авторитетных специалистов в области «ЛАЛ-теста», использование в качестве λ значения 0.03125 МЕ/мл не только повышает надежность испытания, но и является наиболее корректным подходом
- При проведении арбитражного анализа (*в случае положительного или сомнительного результата*) уместно использовать наибольшую величину МДР. Более низкое значение (МДР=30), полученное участником тестирования (код 2), на практике не может привести к выпуску недоброкачественного лекарственного средства, но недопустимо при проведении арбитражного анализа

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Пробоподготовка испытуемого образца

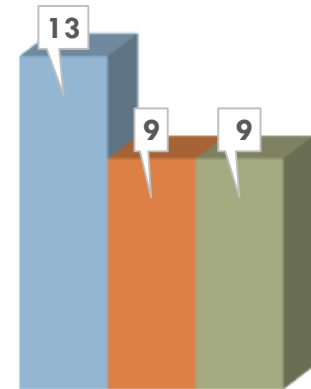
- В двух лабораториях смесь в реакционных пробирках непосредственно перед инкубированием перемешивали в течение 30 с, согласно инструкции лизата - 1-2 с. Такая процедура пробоподготовки может быть причиной нарушения гелеобразования и получения ошибочного отрицательного результата. Иной режим встряхивания, в течение 20-30 с, производитель лизата предусмотрел для одновременного перемешивания штатива с пробирками в шейкере (*в перечне оборудования шейкер не указан*).
- В лаборатории (код 2, 6 и 9) на этапе пробоподготовки предложили использовать объемы растворов, которые несколько повышают *неопределенность* испытания. Учитывая, широкие возможности выбора смешиваемых объемов, следует избегать процедуры с многократными (более 10 раз) пассажами для достижения необходимого объема, а также избегать использования объемов, точность измерения которых невозможно обеспечить в рутинной практике.
- Выбранные при разведении объемы растворов превышали рабочий и *max* объем пробирки для разведения

Коефіцієнт розведення	Об'єм води для БЕГ, мл	№ ²	Об'єм розчину ...ТО, мл	№ ²
1:14	14,000	1	1,000	1

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Пробоподготовка испытуемого образца

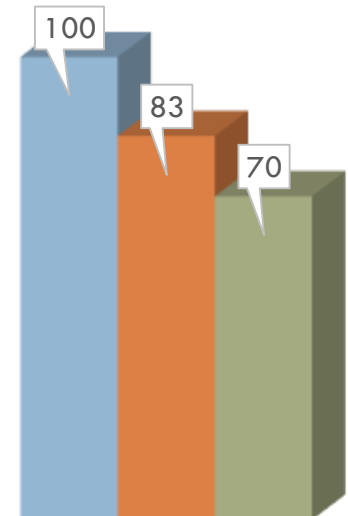
- 13 % участников для коррекции неоптимального рН испытуемого образца добавляли буферный раствор, 9 % - добавляли 0.1 М раствор натрия гидроксида; 9 % - использовали лизат, растворенный в буферном растворе, что согласуется с рекомендациями фармакопеи о методах коррекции рН.



ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Процедура испытания

- Все (100 %) участников тестирования выполнили испытание по показателю «Бактериальные эндотоксины», подтвердив соответствие ТО установленным требованиям.
- Некоторые лаборатории представили Протокол 1.(ii). *Испытания на наличие мешающих факторов*, и результаты количественного испытания ТО.
- Из 23 лабораторий 83 % провели испытание в соответствии с требованиями ГФУ/ЕФ 2.6.14. и только 70 % участников выполнили также все рекомендации производителя лизата и использовали приемы, снижающие вариабельность метода и неопределенность результатов контроля.



ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ УЧАСТНИКОВ

Процедура испытания

- Участник (код 2) не проводил определение pH в смеси лизата и испытуемого образца, которое в испытуемой пробе (1:15) вряд ли достигало рекомендуемых фармакопеей значений (pH=6.0-8.0). В *положительном контроле на препарат* концентрация испытуемого раствора/стандартного препарата эндотоксина была ниже, чем в испытуемой пробе (код 2 и 26), что позволяет оспорить результат испытания
- Участник (код 9) не указал в Протоколе испытания объем раствора стандартного препарата эндотоксина, добавляемый в реакционную пробирку, что не позволяет оценить правильность выполнения данного этапа испытания
- **Обращает внимание корректность проведения испытания с соблюдением всех фармакопейных требований в целом и в деталях эксперимента, знание теоретических и практических рекомендаций, что безусловно является подтверждением профессионализма участников (код 3, 22, 25 и 40)**

ВЫВОДЫ

1. В тестировании по показателю Испытание тестового образца на бактериальные эндотоксины гель-тромб методом приняло участие 23 лаборатории. Все (100 %) участников получили удовлетворительные результаты тестирования.
2. Результаты 1 лаборатории (код 2) получены не в полном соответствии с требованиями общей статьи «Бактериальные эндотоксины» и могут быть оспорены. Результаты еще 3 лабораторий (коды 9, 26 и 27) содержат неполные или противоречивые данные, что не позволяет оценить выполненное ими тестовое задание на всех его этапах и в полном объеме.
3. Полученные результаты тестирования свидетельствуют о удовлетворительном качестве проведения испытания по показателю «Бактериальные эндотоксины» в лабораториях фармацевтической отрасли, однако ряд лабораторий нуждается в проведении корректирующих действий, повышении квалификации персонала лабораторий в части выполнения испытания «Бактериальные эндотоксины».