

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2024-58-2-51-55  
© Коллектив авторов, 2024

О. В. Шаповалова<sup>1,\*</sup>, А. Д. Тутнова<sup>2</sup>, Н. П. Неугодова<sup>1</sup>, Г. А. Сапожникова<sup>1</sup>

## ОБЗОР СОВРЕМЕННОГО РЫНКА РЕАКТИВОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

<sup>1</sup> “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

<sup>2</sup> ООО “Альгимед”, Россия, 121087, Москва, ул. Василисы Кожиной, 1, ДЦ “Парк Победы”, секция 2, эт. 10, пом. 15.

\* e-mail: shapovalova@expmed.ru

В сравнительном исследовании с реактивами, полученными из гемолимфы атлантического и азиатского мечехвостов, установлена надежность получаемых результатов при определении бактериальных эндотоксинов. Отмечено, что ферментативная активность лизата амёбоцитов может различаться в отношении стандарта эндотоксина и природного эндотоксина.

**Ключевые слова:** бактериальные эндотоксины; лизат амёбоцитов; ТАЛ-реактив; ЛАЛ-реактив.

Мониторинг наличия пирогенных примесей необходим для многих отраслей народного хозяйства, таких как фармацевтическая промышленность, медицинские изделия, медицина, пищевая промышленность и пр.

Бактериальные эндотоксины (БЭ) являются основным агентом, вызывающим пирогенную реакцию. В фармацевтической отрасли необходимо определение БЭ на различных этапах производства и, главное, в готовом продукте. Для обнаружения БЭ используют реактивы природного происхождения или созданные с применением технологии синтеза рекомбинантных белков. Рынок реактивов сегментируется по способу получения реактивов, составу реактивов и географии поставок, а также методу определения, для которого они предназначены [1].

Государственная фармакопея РФ, ФЕАЭС и другие фармакопеи мира предусматривают использование реактива, представляющего собой лизат амёбоцитов, получаемый из гемолимфы мечехвостов. Для их производства используют мечехвостов двух видов — *Limulus* (ЛАЛ-реактив) и *Tachypleus* (ТАЛ-реактив) [2 – 5]. Поскольку вид *Limulus* обитает только в Соединенных Штатах Америки (США), ЛАЛ-реактив, в основном, там же и производится, однако продается по всему миру. Темпы роста реализации американского ЛАЛ-реактива связаны с развитием нормативно-правовой базы, хорошей инфраструктурой здравоохранения и широким охватом контроля за содержанием БЭ. ТАЛ-реактив в основном востребован в Азиатско-Тихоокеанском регионе, так как производит-

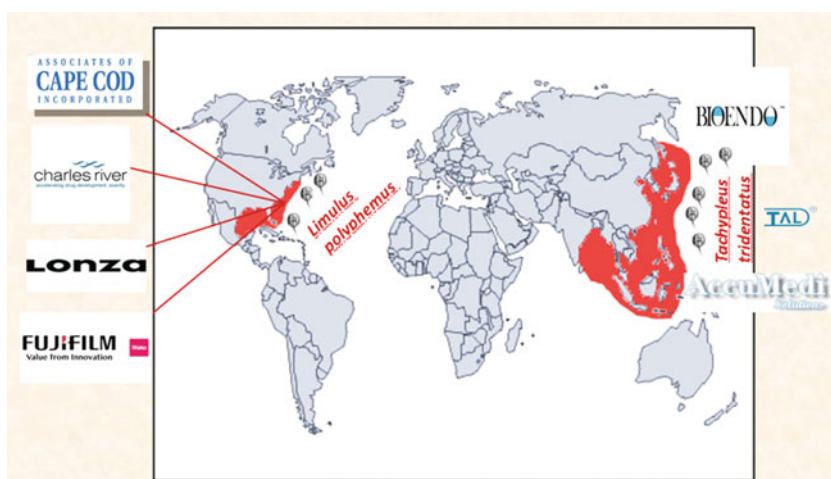


Рис. 1. Карта распространения мечехвостов и географического расположения производителей лизата амёбоцитов.

ся из гемолимфы мечехвоста *Tachypleus*, обитающего в Азии [6, 7].

В начале освоения ЛАЛ-теста в России, в конце XX века, использовались реактивы американских компаний, которые первыми начали поставки в нашу страну ЛАЛ-реактива: “Associates of Cape Cod”, “Charles River Endosafe” и “Lonza Walkersville, Inc.” (ранее “BioWhittaker”). В настоящее время, в связи с растущим спросом на реактивы для тестирования БЭ, перечень компаний-производителей реактивов для мониторинга пирогенных примесей значительно увеличился за счёт рынка Азиатского континента, который предлагает ТАЛ-реактив (рис. 1).

Для того чтобы оставаться конкурентоспособными, производители реактивов для определения БЭ вносят значительный вклад в рост рынка сбыта, используя различные стратегии, включая международное сотрудничество, финансирование и внедрение новых наборов для быстрого и простого выполнения анализов [7, 8]. Некоторые компании в соответствии с концепцией 3R начали разрабатывать наборы с рекомбинантным белком фактора С взамен природного реактива (табл. 1). Ещё одним направлением для сокращения числа животных, используемых при определении пирогенных примесей, является тест активации моноцитов, в котором используются наборы с клетками крови человека [9 – 11].

Несмотря на появление новых реактивов и методов определения пирогенных примесей, наиболее востребованы ЛАЛ- и ТАЛ-реактивы, которые имеют различную чувствительность и назначение. Дополнительно для проведения испытаний могут потребоваться буферные растворы для восстановления лизата амёбоцитов и корректировки pH испытуемых растворов, вода для определения БЭ (вода для БЭТ), реактивы для устранения влияния бета-глюканов и ковалентного связывания двухвалентных катионов, которые также предлагают производители ЛАЛ- и ТАЛ-реактивов.

В соответствии с методами анализа, указанными в ОФС “Бактериальные эндотоксины” [2, 3], представленный на российском рынке ассортимент реактивов

лизата амёбоцитов можно классифицировать по методу определения БЭ:

1. Гель-тромб тест;
2. Турбидиметрический кинетический тест;
3. Хромогенный кинетический тест;
4. Хромогенный тест по конечной точке.

Реактивы различаются по составу, фасовке, условиям хранения. Для примера, некоторые ЛАЛ/ТАЛ-реактивы и стандарт эндотоксина поставляются не только во флаконах, но и в пробирках или ампулах. Кроме того, один и тот же набор реактивов может быть предназначен для двух методов (например, турбидиметрический кинетический метод и гель-тромб тест; хромогенный кинетический и хромогенный по конечной точке) или одного фотометрического метода, но с использованием разного считывающего оборудования, например с ридером для пробирок (Toxinometer®, Pyros Kinetix®) или ридером для микропланшет (например, Bio Tek, Tecan Sunrise) [13, 14].

Ферментативную активность каждой партии лизата амёбоцитов оценивают с использованием эталонного стандарта эндотоксина или контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ). Эндотоксин, используемый для приготовления КСЭ, получают из штамма *Escherichia coli* с помощью дополнительной очистки. Таким образом, КСЭ является высокоочищенным липополисахаридом, в составе которого присутствуют стабилизирующие наполнители, такие как крахмал, человеческий сывороточный альбумин и полиэтиленгликоль. Природный эндотоксин, в отличие от КСЭ, не подвергается очистке и обычно принимает форму макромолекулярного комплекса липополисахарида, белков клеточной мембраны и фосфолипидов, которые выделяются грамотрицательными бактериями во время роста и гибели. Поэтому существует вероятность различия в результатах анализа эндотоксина из окружающей среды по сравнению со стандартами очищенного эндотоксина [12].

Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ способности ЛАЛ/ТАЛ-реактивов выявлять пирогенные примеси и особенностей их использования для оценки наличия БЭ.

Таблица 1

Перечень производителей реактивов для определения бактериальных эндотоксинов разными методами, представленных на российском рынке

Наименование компании производителя реактивов для определения БЭ	Гель-тромб тест	Турбидиметрический кинетический тест	Хромогенный кинетический тест	Хромогенный тест по конечной точке	Метод с использованием рекомбинантных реактивов
Associates of Cape Cod (далее ACC)	+	+	+	+	+
Charles River Endosafe (далее Endosafe)	+	+	+	+	–
Lonza Walkersville, Inc. (далее Lonza)	+	+	+	–	+
Fujifilm Wako Chemicals (далее Wako)	+	+	+	–	+
Xiamen Bioendo Technology Co., Ltd. (далее Bioendo)	+	+	+	+	+
Zhanjiang Bokang Marine Biological Co., Ltd. (далее AccuMedi)	+	+	–	–	–
Fuzhou XinBei Biochemical Industrial Co. Ltd. (далее XinBei)	+	+	+	+	–

“+” – компания производит реактивы для данного метода.

## Экспериментальная часть

Объектами исследования были выбраны наборы реактивов 4 компаний-производителей ЛАЛ-реактива (*ACC*, *Endosafe*, *Lonza*, *Wako*) и 3 компаний-производителей ТАЛ-реактива (*Bioendo*, *AccuMedi*, *XinBei*). Чувствительность лизата амёбоцитов исследованных наборов была разной: от 0,25 до 0,005 ЕЭ/мл

Для исследования особенностей применения реактивов с их помощью выполняли предварительные анализы в соответствии с ОФС “Бактериальные эндотоксины” [2, 3]: проверяли заявленную чувствительность лизата амёбоцитов с помощью гель-тромб теста и достоверность критериев стандартной кривой кинетическими методами (турбидиметрический и хромогенный), а затем определяли содержание природного неочищенного эндотоксина в воде питьевой.

Подготовку реактивов осуществляли согласно указаниям инструкций к ним и сертификатам анализа.

Каждый набор для гель-тромб теста имел свои отличия в разведениях и условиях хранения реактивов (табл. 2). Так, например, при использовании лизата амёбоцитов, расфасованного в пробирки/ампулы, реактив восстанавливали испытуемыми растворами и инкубировали полученную реакцию смесь в этих же пробирках или ампулах (*ACC*, *AccuMedi*). Лиофилизированный реактив компании *XinBei*, расфасованный в ампулы, растворяли 0,5 мл воды для БЭТ и использовали данный объем для анализа небольшого количества проб.

При выполнении турбидиметрического кинетического теста использовали наборы реактивов, предназначенные для анализов в микропланшетах, а также комплексные или универсальные реактивы, которые можно использовать и для гель-тромб теста и для инструментального метода (например, *ENDOSAFE® KTA™*). Для разведения ЛАЛ/ТАЛ-реактива исполь-



Рис. 2. Гелеобразование реакционной смеси в ампуле ТАЛ-реактива с чувствительностью 0,25 ЕЭ/мл.

зовали воду для БЭТ или специальный буфер для разведения (например, для *Lonza* и *Bioendo*), поставляемый в наборе к реактивам. В работе с ЛАЛ/ТАЛ-реактивами *Lonza*, *Wako* и *Bioendo* использовали технику обратного дозирования, так как в противном случае растворённый реактив пенился и образовывал пузыри в лунках. При установке параметров считывания на приборе учитывали требования, указанные в инструкциях к наборам: значения оптической плотности OD, длина волны и интервалы считывания. Длина волны в опытах для турбидиметрического теста с набором реактивов *PYROSTAR™ ES-F/Plate (Wako)* составляла 405 нм и отличалась от общепринятой — 340 нм (табл. 3).

С использованием наборов реактивов для хромогенного кинетического теста выполняли испытание при одной длине волны, меняя только значение OD. Как и в турбидиметрическом кинетическом методе, к испытуемым растворам добавляли по 50 мкл восстановленного лизата амёбоцитов компаний *ACC* и *Wako*,

Т а б л и ц а 2

### Особенности работы с реактивами для определения БЭ в гель-тромб тесте

№	Наименование набора реактивов	Разведённый КСЭ		ЛАЛ/ТАЛ-реактив		Фасовка реактивов
		Концентрация (ЕЭ/мл)	Условия и срок хранения	Условия и срок хранения после восстановления	Условия и срок хранения после замораживания	
1	Pyrotell® ( <i>ACC</i> )	500 – 1000	2 – 8 °С, 7 дней (10 нг/фл.), 4 нед (0,5 мкг/фл.), 3 мес (125 мкг/фл.)	2 – 8 °С, 24 ч –	–20 °С, 3 мес –	Флаконы пробирки
2	Endosafe® ( <i>Endosafe</i> )	20 – 40	2 – 8 °С, 4 нед	2 – 8 °С, 24 ч	–20 °С, 28 дней	Флаконы
3	PYROGENT ( <i>Lonza</i> )	10 – 20	2 – 8 °С, 4 нед	2 – 8 °С, 24 ч	–10 °С, 4 нед	Флаконы
4	PYROSTAR™ ES-F ( <i>Wako</i> )	1000	2 – 8 °С, 1 мес	2 – 8 °С, 4 – 8 ч	–15 ± 5 °С, 2 нед	Флаконы
5	Xiamen Bioendo Technology ( <i>Bioendo</i> )	50	2 – 8 °С, <20 ЕЭ/мл, 24 ч, >20 ЕЭ/мл, 7 дней	10 мин	–20 °С, 28 дней	Флаконы
6	Endotoxin Assay Kit ( <i>AccuBet</i> )	10 – 20	–10 °С, 15 дней, допускается многократная разморозка	–	–	Ампулы
7	Gel Clot TAL ( <i>XinBei</i> )	10	–10 °С, 15 дней, допускается многократная разморозка	2 ч	–	Ампулы

в отличие от остальных ЛАЛ/ТАЛ-реактивов, где предусмотрен объем 100 мкл (табл. 4).

Для оценки работоспособности реактивов в отношении природного эндотоксина проводили испытания образца “Вода питьевая” количественным анализом гель-тромб теста с использованием наборов реактивов разной чувствительности и происхождения (табл. 5). Для определения БЭ готовили двукратные разведения в воде для БЭТ. Исследование выполняли в разведениях, начиная с 1:2 вплоть до разведения, в котором фиксировали отсутствие геля в испытуемых растворах.

### Результаты и их обсуждение

Все реактивы были стабильны и обладали заявленной чувствительностью в присутствии очищенного эндотоксина. В испытаниях “Подтверждение заявленной чувствительности лизата амёбоцитов” с помощью гель-тромб теста образовывался плотный гель в пробах с растворами КСЭ с концентрацией в 2 раза больше, чем чувствительность реактива (рис. 2).

Результаты, полученные в фотометрических методах анализа, соответствовали требованиям достоверности критериев для стандартной калибровочной кривой.

Количественным анализом гель-тромб теста в образце “Вода питьевая” обнаружены БЭ. Диапазоны концентраций БЭ различались в зависимости от чувствительности лизата амёбоцитов ( $\lambda$ ) и его производителя (рис. 3).

В испытаниях с лизатом амёбоцитов, полученным из гемолифы мечехвоста *Limulus*, обнаружено большее количество БЭ в воде питьевой, чем с лизатом

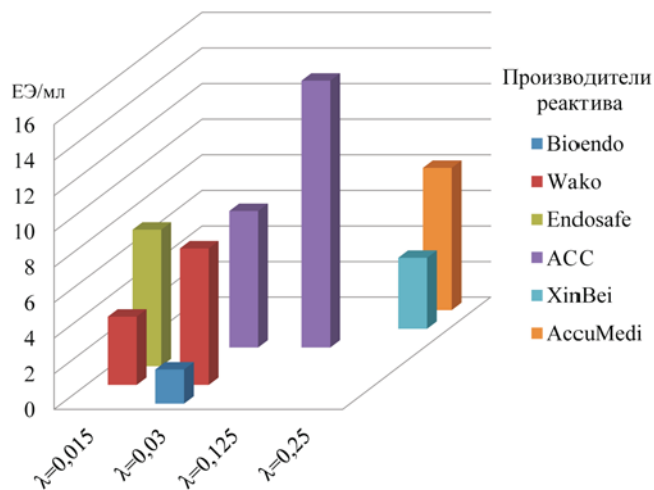


Рис. 3. Результаты анализа образца “Вода питьевая” количественным гель-тромб тестом.

*Tachypleus*, при использовании реактивов одинаковой чувствительности. Параллельно с этим отмечена разница в результатах в зависимости от ферментативной активности ЛАЛ-реактива. Так, например, с ЛАЛ-реактивом  $\lambda = 0,125$  ЕЭ/мл содержание БЭ составило более 15,6 ЕЭ/мл, а с ЛАЛ/ТАЛ-реактивами  $\lambda = 0,03$  и  $\lambda = 0,015$  ЕЭ/мл концентрация БЭ была в диапазоне 3,84 – 7,68 ЕЭ/мл. Значения, полученные для реактивов с чувствительностью 0,015 и 0,03 ЕЭ/мл, подтверждают наличие двукратной ошибки для ЛАЛ/ТАЛ-теста.

Таким образом, в работе с реактивами, полученными из гемолимфы атлантического и азиатского мечехвостов, установлена надежность получаемых резуль-

Таблица 3

### Особенности работы с реактивами для определения БЭ в турбидиметрическом кинетическом тесте

Наименование набора реактивов	ЛАЛ/ТАЛ-реактив				Параметры считывания
	Чувствительность (ЕЭ/мл)	Добавляемый объем в микропланшет (мкл)	Условия и срок хранения после восстановления	Условия и срок хранения после замораживания	
Pyrotell®-T (ACC)	0,001	50 или 100	2 – 8 °С, 24 ч	–20 °С, 3 мес	340 нм OD = 0,03 – 0,2
ENDOSAFE® KTA™ (Endosafe)	0,05	100	2 – 8 °С, 24 ч	–20 °С, 28 дней	340 нм, OD = 0,05 – 0,2
ENDOSAFE® KTA2™ (Endosafe)	0,005	100	2 – 8 °С, 24 ч	–20 °С, 28 дней	340 нм, OD = 0,05 – 0,2
Pyrogent-5000 (Lonza)	0,01	100	2 – 8 °С, 8 ч	-	340 нм, OD = 0,03
PYROSTAR™ ES-F/Plate (Wako)	0,01	50	2 – 8 °С, 6 ч	–15 ± 5 °С, 2 нед	405 нм, OD = 0,015
Bioendo™ KT (Bioendo)	0,005	100	10 мин	-	340 нм, OD = 0,03

Таблица 4

### Особенности работы с реактивами для определения БЭ в хромогенном кинетическом тесте

Наименование набора реактивов	ЛАЛ/ТАЛ-реактив				Параметры считывания
	Чувствительность (ЕЭ/мл)	Добавляемый объем в микропланшет (мкл)	Условия и срок хранения после восстановления	Условия и срок хранения после замораживания	
Pyrochrome® (ACC)	0,001	50 или 100	2 – 8 °С, 8 ч	-	405 нм, OD = 0,03 – 0,2
Chromo-LAL® (ACC)	0,005	100	2 – 8 °С, 24 ч	–20 °С, 2 нед	405 нм, OD = 0,03 – 0,2
ENDOCHROME-K™ (Endosafe)	0,005	100	2 – 8 °С, 24 ч	–20 °С, 2 нед	405 нм, OD = 0,03 – 0,2
Kinetic-QCL™ (Lonza)	0,005	100	2 – 8 °С, 8 ч	–10 °С, 2 нед	405 нм, OD = 0,2
Limulus Color KY (Wako)	0,0005	50	2 – 10 °С, 6 ч	–80 °С, 2 нед	405 нм, OD = 0,015
Bioendo™ KC (Bioendo)	0,005 – 0,001	100	10 мин	–20 °С, 2 нед	405 нм, OD = 0,2

**Перечень реактивов, используемых в анализе образца “Вода питьевая”**

№	Производитель реактива	Чувствительность (ЕЭ/мл)	Тип реактива	Фасовка реактива
ЛАЛ-реактив				
1	ACC	0,125	ЛАЛ	Пробирки*
2	ACC	0,03	ЛАЛ	Флаконы
3	Wako	0,03	ЛАЛ	Флаконы
4	Wako	0,015	ЛАЛ	Флаконы
5	Endosafe	0,015	ЛАЛ	Флаконы
ТАЛ-реактив				
6	XinBei	0,25	ТАЛ	Ампулы
7	AccuMedi	0,25	ТАЛ	Ампулы*
8	Bioendo	0,03	ТАЛ	Флаконы

\* Инкубирование реакционной смеси выполняли в данной ёмкости.

татов. Перед использованием каждого набора реактивов следует внимательно изучить инструкцию и сертификат анализа к нему: обратить внимание на состав, условия разведения и хранения, а также на параметры определения БЭ.

Отмечено, что ферментативная активность лизата амёбоцитов может различаться в отношении стандарта эндотоксина и природного эндотоксина, присутствующего в лекарственных средствах. Причиной этого может быть чувствительность лизата амёбоцитов, технологический процесс его получения, а также добавленные вспомогательные вещества. Поэтому существует вероятность вариабельности результатов испытания с использованием реактивов лизата амёбоцитов различных производителей. Необходимо учитывать этот факт особенно при контроле качества лекарственных средств, содержащих значительное количество БЭ.

**Вклад авторов**

О. В. Шаповалова — обоснование концепции исследования, сбор данных литературы, планирование исследования, написание текста; А. Д. Тутнова — проведение сравнительного анализа, оформление и редактирование текста; Н. П. Неугодова — обобщение результатов исследования и критический пересмотр текста рукописи; Г. А. Сапожникова — получение первичных данных, их анализ и систематизация.

**Благодарность**

Авторы выражают особую благодарность и признательность компании ООО “Альгимед” за сотрудничество при написании научной статьи.

**REVIEW OF THE MODERN MARKET OF REAGENTS FOR THE DETECTION OF BACTERIAL ENDOTOXINS IN DRUGS**

O. V. Shapovalova<sup>1\*</sup>, A. D. Tutnova<sup>2</sup>, N. P. Neugodova<sup>1</sup>, and G. A. Sapozhnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051 Russia

<sup>2</sup> Algimed, Moscow, 121087 Russia

\* e-mail: shapovalova@expmed.ru

A comparative study carried out with reagents obtained from the hemolymph of the Atlantic and Asian horseshoe crabs proved the reliability of the determination of bacterial endotoxins. It is noted that the enzymatic activity of amoebocyte lysate may differ in relation to the standard endotoxin and natural endotoxin.

**Keywords:** bacterial endotoxins; amoebocyte lysate; TAL reagent; LAL reagent.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Финансирование**

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ “НЦЭСМП” Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

**Подтверждение о предоставлении грантовой поддержки**

Отсутствует.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Endotoxin Testing Market Analysis, Segments, Size, Share, Industry Growth and Recent Trends by Forecast to 2028, EIN Presswire (2021).
2. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV изд., ОФС. 1.2.4.0006.15 (2018).
3. Фармакопея ЕАЭС, ОФС 2.1.6.8 (2019).
4. United States Pharmacopeia, 43th, Monograph 85 (2020).
5. European pharmacopoeia, 11.2, Monograph 2.6.14 (2023).
6. Global Endotoxin Detecting Reagents Market — Industry Trends and Forecast to 2029. Data Bridge Market Research (2021).
7. Pyrogen Testing Market. Global Research Consulting, Blog (2022).
8. Endotoxin Testing Manufacturers and Conservation, Blog (2013); <https://www.horseshoecrab.org/med/manufacturers.html>.
9. Alternative Bacterial Endotoxin Test Methods, Blog (2022); <https://horseshoecrab.org/alternative-bacterial-endotoxin-test-methods/>
10. Can new protections save China’s horseshoe crabs?, Blog (2021); <https://chinadialogueocean.net/en/conservation/18403-can-new-protections-save-chinas-horseshoe-crabs/>
11. Bacterial endotoxin testing: 10 reasons to choose recombinant factor C, Blog (2021); <https://www.biomerieux-industry.com/es/industria-farmaceutica/documentacion-y-webinars/white-papers/2021-03-18-bacterial-endotoxin-testing>
12. Tim Sandle. Variability and Test Error with the LAL Assay. Search American Pharmaceutical Review (2014).
13. Rapid Bacterial Endotoxin Testing (BET), Blog (2016); <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/190862-Rapid-Bacterial-Endotoxin-Testing-BET/>
14. The Detection of Endotoxins Via the LAL test, the Turbidimetric Method, Blog (2014); <https://www.wakopyrostar.com/blog/post/part-2-the-detection-of-endotoxins-via-the-lal-test-the-turbidimetric-method/>

Поступила 04.07.23