

УДК 615.076

ОСОБЕННОСТИ КОНТРОЛЯ ПРЕПАРАТОВ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА НА СОДЕРЖАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

Т.В. Кукунина^{1*}, А.Г. Исрафилов¹, М.Л. Романенкова¹, Р.С. Гайнуллина¹, Л.Г. Федько¹

Резюме. Рассмотрена проблема определения бактериальных эндотоксинов в препаратах альбумина человека. Для повышения безопасности препаратов рекомендован вариант двойного контроля, включающий биологический контроль на кроликах, а также определение бактериальных эндотоксинов методом ЛАЛ-теста. Описаны причины, обосновывающие необходимость двойного контроля препаратов альбумина человека на содержание пирогенов и бактериальных эндотоксинов, основной из которых является особая природа молекулы альбумина, обратимо связывающая большое количество соединений, в том числе эндотоксины. Изложены известные причины ложноположительных и ложноотрицательных реакций ЛАЛ-теста, а также универсальный вариант пробоподготовки, включающий разведение, температурную обработку и использование специальных диспергирующих агентов.

Ключевые слова: альбумин человека, пирогенность, бактериальные эндотоксины, ЛАЛ-тест, ложноположительные реакции, ложноотрицательные реакции.

PECULIARITIES OF CONTROL OF HUMAN ALBUMIN DRUGS ON THE CONTENT OF BACTERIAL ENDOTOXINS

T.V. Kukurina^{1*}, A.G. Israfilov¹, M.L. Romanenkova¹, R.S. Gaynullina¹, L.G. Fedko¹

Abstract. The problem was considered to determine bacterial endotoxins in human albumin drugs. To improve the safety of medicines the option of dual control was recommended, which includes the rabbit pyrogen test and determining bacterial endotoxins by the LAL-test. The causes described justify the need for dual control of albumin drugs on the content of the pyrogens/bacterial endotoxins, the main of which is the special nature of the albumin molecule reversibly binding a large number of compounds, including endotoxins. There were given known causes of false-positive and false-negative reactions of the LAL-test, and sample preparation variant including dilution, temperature treatment and the use of special dispersing agents.

Keywords: human albumin, pyrogenicity, bacterial endotoxin, LAL-test, false-positive reactions, false-negative reactions.

1 – Филиал ФГУП «НПО «Микроген» в г. Уфа «Иммунопрепарат», 450014, Россия, г. Уфа, ул. Новороссийская, д. 105

1 – Branch of Stock Company «Scientific-production Association «Microgen» in Ufa «Immunopreпарат», 105, Novorossiyskaya str., Ufa, 450014, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: tatiana-kukurina@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Среди препаратов плазмы крови, применяемых в клинической практике, первое место по частоте и объему трансфузий принадлежит человеческому альбумину. Главная и перво-степенная задача производителей препаратов альбумина человека состоит в том, чтобы обеспечить максимальное отсутствие побочных реакций, среди которых пирогенные занимают лидирующее место по частоте и тяжести [1–3]. Пирогены/эндотоксины ответственны за развитие лихорадочных и гемолитических реакций, острой почечной недостаточности, шока, приводящих в некоторых случаях даже к летальному исходу.

Известно, что альбумин может связываться с эндотоксинами, делая их при этом недоступными для определения с помощью ЛАЛ-

теста [4, 5]. В связи с тем, что данное связывание носит обратимый характер, содержание бактериальных эндотоксинов (БЭ) в препаратах альбумина человека при хранении может повышаться, что несет очевидную угрозу здоровью и жизни пациентов. По этой причине за рубежом все препараты альбумина при выпуске подвергаются двойному контролю на содержание бактериальных эндотоксинов и пирогенов, что позволяет снизить риск повышения БЭ во время хранения. В то же время самый простой вариант ЛАЛ-теста, полуколичественный гель-тромб-тест, может не показывать достоверного содержания БЭ в препаратах, при этом могут иметь место как ложноположительные, так и ложноотрицательные реакции. В связи с этим, учитывая высокую актуальность данного вопроса для инфузионных препаратов, особенно для препаратов из плазмы крови, остановимся подробнее на некоторых нюансах контроля БЭ.

Препараты альбумина человека, как и все препараты плазмы крови, должны контролироваться на содержание БЭ с помощью количественных валидированных методов, дающих достоверные результаты, тем более что содержание БЭ относится к показателю безопасности. Для России этот вопрос остается пока открытым, так как основным методом контроля пирогенности остается биологический тест на кроликах.

КОНТРОЛЬ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

Основным методом контроля пирогенности долгое время являлся биологический тест на кроликах, который позволял контролировать только готовые препараты. Сущность данного метода заключается во внутривенном введении трем кроликам стерильного раствора и фиксации изменения температуры. При повышении температуры кроликов выше допустимой нормы препарат считается пирогенным [6, 7]. Впервые биологический метод контроля пирогенности на кроликах вошел в Фармакопею США XII издания в 1942 г. [8].

С 1970 по 1974 гг. двенадцатью основными производителями ЧСА в США было получено 219 рекламационных писем о пирогенных реакциях, вызванных инфузиями 25% растворов альбумина человека. Все препараты прошли биологический контроль на кроликах как на момент выпуска, так и на момент отзыва и могли считаться апиrogenными [3]. Эти случаи, вероятно, послужили основанием к проведению масштабных исследований по изучению природы пирогенов/эндотоксинов в фармацевтических препаратах, разработки методов их определения и способов удаления.

Ранее было установлено, что в патогенезе пирогенной реакции ключевую роль играют эндотоксины (липополисахариды) [9], которые являются составной частью мембранной оболочки грамотрицательных бактерий. По своему химическому строению эндотоксины являются гетерополимерами, которые включают липидные и полисахаридные фрагменты. Хотя сами по себе эндотоксины не являются токсичными веществами, однако их попадание в организм активирует отдельные звенья иммунной системы, в основном процесс идет через активацию моноцитов и макрофагов, что приводит к высвобождению целого ряда медиаторов воспаления, таких как фактор некроза опухоли, интерлейкины (особенно ИЛ-6 и ИЛ-1), и других агентов. Развитие каскадной противовоспалительной реакции, сопровождающейся повышением температуры и лихорадкой (так называемый эндотоксический шок), может привести к летальному исходу [10, 11].

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ ЛАЛ-ТЕСТА

Разработка метода определения БЭ была основана на исследовании того факта, что заражение мечехвоста *Лимулус* (*Limulus polyphemus*), вызванное грамотрицательными бактериями, приводит к обширному внутрисосудистому гемолимфоидному гелеобразованию, что ведет к смерти членистоногого [12]. Последующие работы [13, 14] показали, что такая внутриклеточная коагуляция вызвана реакцией между эндотоксином и коагулирующим белком в амебоцитах, циркулирующих в гемолимфе мечехвоста. Данный принцип в дальнейшем лег в основу коммерческих препаратов для определения эндотоксинов *in vitro* [15]. Поскольку первые исследования проводились на мечехвостах вида *Limulus polyphemus*, препарат, полученный из их крови, был назван лизатом амебоцитов Лимулус или сокращенно ЛАЛ-реактив, анализ получил название ЛАЛ-тест [16]. В 1977 г. этот тест был принят и рекомендован United States Food and Drug Administration (FDA) и Федеральным регистром США (42FR 57749) как стандартный метод определения БЭ [17]. К 1983 г. в руководстве FDA было указано, что ЛАЛ-тест может использоваться для контроля эндотоксинов в готовой лекарственной продукции. Эти тесты были описаны в серии проектов и руководствах, одним из которых являлось руководство FDA по валидации ЛАЛ-теста в качестве теста на эндотоксины готовых парентеральных препаратов медицинского и ветеринарного назначения, биологических продуктов, медицинского оборудования [18]. FDA подтвердило, что опубликованные документы United States Pharmacopeia (USP) и Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), описывающие методы и способы расчета пирогена, а также допустимые концентрации эндотоксинов, обеспечивают производителей препаратов всей необходимой информацией как на стадиях производства, так и на этапах контроля [19–21].

В дальнейшем данный подход позволил осуществить внедрение ЛАЛ-теста для поэтапного контроля производственного процесса, что помогло установить фактическую пирогенность 45% коммерческих серий препарата альбумина человека, считавшихся апиrogenными по биологическому тесту на кроликах, а также провести контроль содержания БЭ в процессе производства с выявлением стадий и материалов, ответственных за их внесение.

ВАРИАНТЫ МЕТОДА ЛАЛ-ТЕСТА

Для качественного и количественного определения содержания эндотоксинов разработаны три принципиально отличающихся между собой варианта ЛАЛ-теста [19, 21–23]:

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

Гель-тромб-тест – это самый простой вариант ЛАЛ-теста и требует минимального лабораторного оборудования. Положительным результатом считается образование твердого гель-тромба на дне реакционной пробирки, который остается без изменений при переворачивании (выдерживает переворачивание без разрушения). Концентрацию эндотоксинов в испытуемом образце можно определить как самое высокое полученное разведение, при котором еще наблюдается коагуляция, умноженное на чувствительность ЛАЛ-реактива [24, 25].

Турбидиметрический метод может проводиться в двух вариантах: по конечной точке и кинетический. Этот тест основан на измерении степени мутности, развивающейся в образце вследствие осаждения коагулогена из ЛАЛ-реактива при увеличении концентрации эндотоксина. Реактив для этого теста содержит коагулоген в количестве, достаточном для образования мутного раствора, но недостаточном для образования твердого геля при действии на лизат эндотоксина [16]. В варианте турбидиметрического метода по конечной точке после необходимого времени инкубирования (обычно 1 ч) проводится измерение оптической плотности (ОП) разведений испытуемого образца (при 405 нм), которая коррелирует с концентрацией эндотоксина по калибровочной кривой, построенной с использованием разведений стандартного образца эндотоксина [24, 26]. Чем выше концентрация эндотоксинов в образце, тем больше абсорбция при фотометрическом измерении. В данном случае количественно определяется только та концентрация эндотоксина, которая может вызывать появление измеримой мутности в течение инкубирования.

В отличие от первого варианта в кинетическом турбидиметрическом методе измерение ОП происходит в течение всего времени инкубирования через одинаковые промежутки времени. Чем выше концентрация эндотоксина в образце, тем быстрее будет протекать реакция и тем меньше времени потребует для достижения предельной ОП.

В 1977 г. Nakamura с соавторами [27] обнаружил, что активированный эндотоксином ЛАЛ-реактив мо-

жет также отщеплять небольшие хромогенные пептиды примерно в тех же местах, что и в коагулогене, этот принцип в дальнейшем и лег в основу хромогенного метода ЛАЛ-теста. Коагулирующий фермент, активированный в каскаде реакций, отщепляет хромофор – *п*-нитроанилин (ПНА) от хромогенного субстрата, вызывая при этом желтое окрашивание. После необходимого времени инкубирования (обычно 1 ч) количество высвобожденного ПНА, которое измеряется фотометрически (при 405 нм), пропорционально количеству эндотоксинов в образце. Чем выше концентрация эндотоксинов, тем быстрее протекает реакция и образуется желтое окрашивание [28, 29].

Хромогенный метод ЛАЛ-теста существует в трех вариантах: первые два – по конечной точке, а третий – кинетический [30]. В обоих вариантах метода по конечной точке вышеописанная реакция останавливается после определенного времени инкубирования путем добавления кислоты, после чего происходит фотометрическое измерение ОП смеси. В первом варианте метода по конечной точке комплекс «пептид – ПНА» используется только как источник окрашивания. Во втором варианте, называемом диазохромогенный метод ЛАЛ-теста, высвобождаемый ПНА присоединяется к диазосоединению. Когда реакция останавливается, итоговая смесь становится ярко-красного цвета и ее оптическая плотность измеряется на более высокой длине волны – 540 нм. Чем выше концентрация эндотоксинов в образце, тем больше ПНА высвобождается из пептида и тем более насыщенный желтый или ярко-красный цвет будет у финальной смеси. Концентрация эндотоксинов в анализируемом образце традиционно находится по калибровочной кривой, построенной относительно стандарта эндотоксина.

Наиболее сложная модификация ЛАЛ-теста – это кинетический хромогенный вариант. Главный принцип этого теста очень похож на описанный выше, то есть активированный фермент катализирует отщепление ПНА от бесцветного субстрата, вызывая при этом появление желтого окрашивания. Однако фотометрическое измерение проводится непрерывно, в течение всего периода инкубирования (обычно 50–60 мин) через постоянные интервалы времени (например, 30 с). Время, прошедшее до появления желтого окрашивания (время реакции), обратно пропорционально количеству присутствующих эндотоксинов в анализируемом образце. В случае присутствия большого количества эндотоксинов реакция протекает мгновенно. Если содержание эндотоксинов в образце низкое, время реакции становится достаточно продолжительным. Расчет концентрации эндотоксинов в образце основан на компьютерном анализе скорости этих изменений [31].

Таблица 1.

Сравнение методов ЛАЛ-теста [24]

Характеристики	Метод	Гель-тромб-тест	Турбидиметрический тест		Хромогенный тест	
			По конечной точке	Кинетический	По конечной точке	Кинетический
1		2	3	4	5	6
Стоимость		Самая низкая стоимость оборудования	Относительно недорогое, широко доступное оборудование	От средней до высокой стоимости оборудования	Относительно недорогое, широко доступное оборудование	Самое дорогое оборудование
Чувствительность		Чувствительный, как правило, до 0,03 ЕЗ/мл	Самый чувствительный (предел обнаружения – до 0,001 ЕЗ/мл)	Самый чувствительный (предел обнаружения – до 0,001 ЕЗ/мл на LAL-5000)	Более чувствительный (предел обнаружения – до 0,005 ЕЗ/мл)	Более чувствительный (предел обнаружения – до 0,005 ЕЗ/мл)
Рабочий диапазон		Не имеет	0,01–0,1 ЕЗ/мл	0,001–100 ЕЗ/мл	0,01–0,1 ЕЗ/мл	0,005–50 ЕЗ/мл
Разрешающая способность		±200%	±25%	±25% или 50%*	±25%	±25% или 50%*
Восприимчивость к мешающим соединениям		Устойчивый, обычно менее восприимчив к мешающим соединениям, чем другие методы	Имеют больше мешающих факторов, чем гель-тромб-тест, но более высокая чувствительность позволяет нивелировать их разведением образцов			
Временной фактор		Строгое считывание результатов через 1 ч	Критично строгое соблюдение времени протекания реакции	Автоматический контроль времени протекания реакции обеспечивается оборудованием	Критично строгое соблюдение времени протекания реакции, более легкая остановка реакции для чтения результатов, чем в турбидиметрическом тесте по конечной точке	Автоматический контроль времени протекания реакции обеспечивается оборудованием
Требования к реакционной посуде		Пробирки из щелочного стекла	Пробирки из боросиликатного стекла или микропланшеты**	Пробирки из боросиликатного стекла (LAL-5000) или микропланшеты**	Микропланшеты**, иногда пробирки из боросиликатного стекла	Микропланшеты** для быстрого и легкого разведения
Дополнительная информация		Нормативный метод USP. Легкая интерпретация результатов. Возможность одновременного анализа большого количества образцов	–	LAL-5000: очень хороший температурный контроль; индивидуальный контроль температуры каждой лунки; возможность добавления образцов в процессе анализа	Диазотипные опции позволяют тестировать образцы, поглощающие при 405 нм	–

Примечание: * Разрешающая способность кинетических методов зависит от допустимого диапазона степени восстановления. В 1987 г. руководство по валидации ЛАЛ-теста FDA установило, что предел восстановления внутренних стандартов составляет ±25%. В 1991 г. FDA в своем промежуточном руководстве по кинетическим ЛАЛ-техникам увеличило диапазон восстановления до ±50%. Это изменение не распространялось на медицинские изделия.

**Микропланшеты практически не могут быть депирогенизированы пользователем самостоятельно. В случае их использования следует ожидать случайно загрязненных лунок («горячих» лунок). По этой причине каждый раз необходимо использовать чистые планшеты. В качестве варианта рекомендуются планшеты Ruyorplates Ruyorplates Associates of Cape Cod, имеющие сертификат анализа.

В статье «Бактериальные эндотоксины», принятой Европейской Фармакопеей [32], фармакопеями США [19], Японии [33], Китая [34], Российской Федерации [35], разрешается проведение анализа шестью различными методами ЛАЛ-теста (таблица 1):

- качественным гель-тромб-тестом;
- полуколичественным гель-тромб-тестом;
- количественным кинетическим турбидиметрическим тестом;
- количественным кинетическим хромогенным тестом;
- количественным хромогенным тестом по конечной точке;
- количественным турбидиметрическим тестом по конечной точке.

Согласно данным, представленным М.Е. Dawson [24] (таблица 1), наиболее чувствительным вариантом ЛАЛ-теста является турбидиметрический метод. Более широкий рабочий диапазон имеет кинетический метод по сравнению с тестом по конечной точке, что позволяет проводить анализ без дополнительных разведений. Переход от гель-тромб-теста к турбидиметрическому или хромогенному варианту повышает разрешающую способность метода как минимум в 4 раза (с 200 до 50%).

Нормативные документы [18, 36, 37–39] в основном предъявляют близкие требования по содержанию БЭ в препаратах альбумина человека и парентеральных препаратах в целом (таблица 2).

Таблица 2.

Нормативные требования к содержанию БЭ в препаратах альбумина человека

Ссылка на нормативный документ	Метод	ЛАЛ-тест	
		Белок, г/л	Содержание БЭ, ЕЭ/мл
ФС.3.3.2.0006.15 «Альбумин человека», ГФ XIII [36]		50	0,5
		100–200	1,3
		250	1,7
Европейская Фармакопея [37]		не более 50	менее 0,5
		50–200	менее 1,3
		200–250	менее 1,7
Китайская Фармакопея [38]		50	0,50
		100	0,83
		200	1,67
		250	2,08
Требования Японии [39]		50 и 200–250	менее 0,6
Руководство по валидации FDA [18]		50	0,50
		200	1,33
		250	1,67

В китайской ФС [38] предъявляются более мягкие требования по содержанию БЭ (2,08 ЕЭ/мл) для 25% раствора альбумина человека по сравнению с требованиями ГФ XIII [36], ЕФ [37] и FDA [18], однако для 10% раствора альбумина содержание БЭ должно быть не выше 0,83 ЕЭ/мл, тогда как в других, перечисленных выше, нормативных документах допустимым содержанием является 1,3 ЕЭ/мл. Минимальные требования к биологическим продуктам Японии [39] устанавливают наиболее жесткие нормативы содержания БЭ для всех выпускаемых концентраций препарата альбумина человека – 0,6 ЕЭ/мл, в связи с этим можно предположить, что препараты альбумина человека японского производства являются более безопасными по содержанию БЭ во всех выпускаемых концентрациях.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ЛАЛ-ТЕСТА ПО СРАВНЕНИЮ С БИОЛОГИЧЕСКИМ ТЕСТОМ НА КРОЛИКАХ

На сегодняшний день ЛАЛ-тест узаконен многими фармакопеями [19, 32–35] и является альтернативным методом контроля пирогенности. По сравнению с биологическим тестом на кроликах ЛАЛ-тест отличается более высокой чувствительностью (в 10–100 раз), специфичностью и правильностью, кроме того, он считается более экономичным и менее вариабельным, детектирует субпирогенные дозы эндотоксинов, для проведения контроля достаточно небольшого количества образца. Однако метод контроля пирогенности на кроликах является более универсальным в связи с тем, что позволяет выявить пирогенные реакции не только на грамотрицательные бактерии, но и на грамположительные, а также на микобактерии, грибы, вирусы и пр. Несмотря на это, значимым недостатком контроля пирогенности на кроликах является в 10 раз более высокая чувствительность людей к пирогенам по сравнению с кроликами [40, 41], а также известные случаи толерантности отдельных кроликов к пирогенам [42], что может создавать очевидный риск пирогенных реакций для пациентов. Помимо этого, эндотоксины могут находиться в связанном состоянии с альбумином, что приводит к их маскировке и невыявлению. В связи с этим отдельный контроль на содержание эндотоксинов/пирогенов либо тестом на кроликах, либо ЛАЛ-тестом не позволит гарантировать полную безопасность препаратов альбумина человека [8], поэтому многие ведущие производители, основываясь на регламентирующих нормативных документах [43, 44], осуществляют параллельный контроль двумя методами.

Согласно документу European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM) [45] в общей монографии для всех препаратов плазмы крови рекомендован двойной контроль на пирогенность и

эндотоксины. В минимальных требованиях Японии [39] приоритетным методом является тест на эндотоксины, тест на пирогенность проводится только в том случае, когда содержание БЭ превышает установленный критерий 0,6 ЕЭ/мл. Для повышения безопасности по показателю «пирогенность» один из лидеров производства препаратов плазмы крови, фирма Baxter [42], отдает предпочтение ЛАЛ-тесту: частота контроля ЛАЛ-тестом (143 196) в 5 раз превышает частоту проведения теста на кроликах (28 410).

В официальном руководстве Евросоюза по получению разрешения на реализацию серии препарата альбумина человека [44] приводится следующий алгоритм контроля: для промежуточной проверки полуфабриката проводится тест на кроликах, а для официального выпуска серии осуществляется обязательный параллельный контроль как на кроликах, так и с помощью ЛАЛ-теста. Интересен комментарий European Medicines Agency (ЕМЕА) [46]: при наличии противоречивых результатов параллельных тестов – на эндотоксины и пирогены – серии препарата не могут быть выпущены. В монографии Европейской Фармакопеи № 0255 на препарат альбумина человека [37] говорится о приоритетности ЛАЛ-теста только при условии, что все пирогенные субстанции являются эндотоксинами, а также получены положительные результаты валидации метода. В случае отрицательных результатов валидации приоритет отдается тесту на кроликах. При проведении валидации ЛАЛ-теста необходимо применять индивидуальный подход, учитывающий возможность влияния цветности и мутности на результаты хромогенного и турбидиметрического методов [18, 47, 48].

ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ И ЛОЖНООТРИЦАТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ЛАЛ-ТЕСТА

Несмотря на большой успех в разработке количественных методов определения бактериальных эндотоксинов как в готовом препарате альбумина человека, так и на стадиях технологического процесса, известны определенные трудности с получением достоверных результатов, связанные с ложноположительными и ложноотрицательными реакциями [49–52].

Каждая молекула эндотоксина состоит из длинной цепочки гидрофильного сахара, цепочки гидрофобной жирной кислоты и отрицательно заряженной фосфатной группы, в связи с чем эндотоксины связываются с белками, характеризующимися большим разнообразием. Это связывание изменяет мицеллярную и/или агрегированную структуру, что отражается на изменении активности. H.D Hochstein с соавторами и R.C. Skames с соавторами [50, 52] подтверждают существование явления связывания эндотоксинов и мас-

кировки компонентов, которые могут присутствовать в плазме и ее дериватах. Считается, что липидные участки (липид А) молекул эндотоксина, которые являются чувствительными к ЛАЛ-активации, могут становиться ассоциированными, что приводит к невозможности активирования ЛАЛ-реактива. В пункте 4 официального документа ЕМЕА [53] сообщается об обратимом связывании эндотоксина с альбумином, о возможности отсоединения эндотоксина в любой момент времени и его переходе в свободную форму из-за снижения сорбционной функции альбумина во время хранения. Из всех препаратов данный факт характерен только для препаратов альбумина в связи с тем, что молекула альбумина состоит из гомологичных доменов, два из которых имеют открытый гидрофобный «карман», посредством которого идет связывание с липидной частью молекулы эндотоксина [54]. Переход связанного эндотоксина в свободную форму может вызывать появление пирогенной реакции, несмотря на то, что ранее препарат был апиогенным. Альбумин – единственная в своем роде молекула, с которой связывается до 97–99% любых соединений. Поэтому специальная пробоподготовка, предшествующая самому определению эндотоксинов в препарате альбумина, очень важна и должна обеспечивать полный переход эндотоксинов в свободную форму.

Существует несколько факторов, которые могут вызывать не ложноотрицательные, а ложноположительные реакции при постановке ЛАЛ-теста, например, такими факторами являются сами препараты крови и полинуклеотиды [55]. Другим важным источником ложноположительных реакций являются β -1,3-глюканы из грибов, дрожжей (при несоблюдении правил надлежащей производственной практики), целлюлозных материалов. Эти вещества содержат полимеры глюкозы с различной молекулярной массой, связанные главным образом посредством β -1,3-глюкозидных связей. Если присутствует значительное количество β -1,3-глюканов определенного размерного класса, это может привести к появлению ЛАЛ-реакции, не связанной с присутствием бактериальных эндотоксинов [56, 57].

Исследования, проведенные Гематологическим научным центром Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва, А.В. Карякин), подтверждают присутствие β -1,3-глюканов грибов в отечественных препаратах альбумина человека [58]. Однако в зарубежных аналогах данные примеси обнаружены не были, что обусловлено соблюдением правил надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP). В связи с этим для контроля отечественных препаратов альбумина человека требуется использование специфичных тест-систем, учитывающих влияние β -1,3-глюканов, во избежание получения завышенных результатов. При отсутствии высокоспецифичных ЛАЛ-тестов рекомендуется ис-

пользование β -блокаторов (например, β -G-Blocker фирмы Lonza) [59] или специальных буферов (например, Glucashield® фирмы Associates of Cape Cod) [4]. β -блокатор блокирует чувствительный к глюкозам мостик G в ЛАЛ-реактиве, делая его более специфичным к эндотоксинам. Его использование рекомендуется в случаях ожидаемой и/или подтвержденной контаминации β -1,3-глюканами, а также при условии отрицательного ответа, полученного при анализе концентрированного образца, и положительного ответа при повышении степени разведения и, возможно, отрицательного ответа в наибольшем разведении.

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ БЭ

В качестве пробоподготовки при определении эндотоксинов в белковых растворах методом ЛАЛ-теста для удаления эндотоксина из белка предлагается множество методов, однако в РФ официально утвержденных методик или стандартных операционных процедур для препаратов плазмы крови пока не существует. В доступной литературе предлагается обработка перхлорной кислотой [60], фенольная экстракция [61], метод разведения-нагрева [62]. Однако обычные методы – обработка солями, детергентами [63, 64], ультрафильтрация, температурная обработка – часто оказываются неэффективными либо требуют разведения в 10^6 раз [5], что является неприемлемым для гель-тромб-теста. При использовании принципа разведения пробы до нивелирования усиливающего или ингибирующего эффекта мешающих соединений происходит значительное снижение чувствительности метода, так как может понадобиться высокая степень разведения, превышающая предел чувствительности ЛАЛ-реактива. Так, по данным Laurie Fife [65], только концентрация альбумина менее 0,1% не интерферирует с определением эндотоксинов, что требует разведения 20% раствора альбумина человека как минимум в 200 раз, 10% – в 100 раз, 5% – в 50 раз и использования высокочувствительных турбидиметрических и хромогенных методов ЛАЛ-теста. Так, с учетом чувствительности обычно используемого гель-тромб-теста (0,03 ЕЭ/мл) и предельного содержания БЭ в препаратах альбумина человека, согласно ЕФ и ГФ XIII (для 5% раствора альбумина – менее 0,5 ЕЭ/мл, для 10% – менее 1,3 ЕЭ/мл, 20 и 25% – менее 1,7 ЕЭ/мл) [36, 37] необходимые максимально допустимые разведения составят соответственно 16,7; 43,3; 56,7, что, к сожалению, не удовлетворяет необходимым вышеприведенным уровням разведений для снижения влияния мешающих соединений.

По этой причине гель-тромб-тест не может быть использован для контроля БЭ в препаратах альбумина, во-первых, из-за низкой чувствительности метода, а во-вторых, из-за полуколичественной оценки резуль-

татов и невозможности проведения валидации метода в качестве количественного теста. Выходом из создавшейся ситуации является использование только количественных, более высокочувствительных хромогенных или турбидиметрических методов определения эндотоксинов по конечной точке или кинетических. Широкий линейный диапазон данных методов (определяется как отношение максимальной точки линейного диапазона к минимальной и составляет, согласно данным, приведенным в таблице 1, от 10^3 до 10^5 , является безразмерной величиной, так как $\text{max ЕЭ/мл} / \text{min ЕЭ/мл}$ в отличие от гель-тромб-теста позволяет провести валидацию метода при необходимых разведениях препарата альбумина, исключая влияние мешающих соединений [66]. Поэтому на сегодняшний день фирмой Baxter 55% всех ЛАЛ-тестирований осуществляется кинетическим методом (не гель-тромб-тестом), который дает как минимум в 2 раза меньшую величину отклонений по сравнению с гель-тромб-тестом [42].

Однако при определении содержания эндотоксинов в растворе альбумина, сыворотке или плазме крови хромогенным методом на измерение поглощения при 405 нм может оказывать влияние желтый цвет анализируемого образца. В этом случае рекомендуется методом диазотирования перевести высвобожденный хромофор ПНА в азокраситель красного цвета, что позволит повысить чувствительность метода примерно в 2 раза [16], или использовать турбидиметрический метод.

Для устранения эффекта ингибирования и перевода связанных эндотоксинов в свободную форму, а также для удаления мешающего влияния белков и пептидов рекомендуется использовать специальные диспергирующие агенты. Так, фирма Lonza на этапе пробоподготовки предлагает использовать диссоциирующие агенты как других фирм (BioDtech, Inc.'s EndoPrep™) [5], так и своего производства (Pyrosperser™, Dispersing Agent) [67]. Pyrosperser™ Dispersing Agent представляет собой свободный от эндотоксинов раствор металломофицированного полиэлектролита, относящегося к группе металломофицированных полианионных диспергирующих веществ. Его применение рекомендуется для препаратов, в которых причиной ингибирования является связывание эндотоксинов или присутствие маскирующих компонентов. На сегодняшний день Pyrosperser™ Dispersing Agent с успехом применяется для ЛАЛ-тестирования таких препаратов, как человеческий сывороточный альбумин 5 и 25%, фракция белков плазмы, растворы электролитов, антигемофильный фактор, липидные эмульсии и др. Диспергирующий реагент добавляется к тестируемому образцу до самого ЛАЛ-тестирования. Его концентрация подбирается индивидуально, посредством экспериментов. Однако проведенные исследования показали, что концентрации Pyrosperser™

Dispersing Agent, превышающие или эквивалентные 1/2,5 (объем/объем), не являются эффективными. Поэтому рекомендуется добавлять его таким образом, чтобы финальная концентрация в анализируемом образце составляла 1/50 [67].

Известно, что наибольшие сложности возникают при определении бактериальных эндотоксинов в крови, плазме или препаратах, полученных из них [16]. Однако эту проблему можно решить, проводя специальную пробоподготовку, включающую разведение, температурную обработку и воздействие специальных агентов [68, 69].

Так, предлагается проводить следующую пробоподготовку [69, 70], включающую температурную обработку (при 60–65 °С в течение 30 мин или при 37 °С в течение 60 мин), снижение ионной силы (pH) до значения 1–4 (посредством подбора необходимого разведения и ионной силы) и деградацию не сериновыми протеазами (к 30 мкл образца добавляется 270 мкл ESP™-буфера № 1 с кислым значением pH, содержащим двухвалентные катионы, и 30 мкл ESP™-раствора протеаз, далее проводится инкубирование при перемешивании на водяной бане при 37 °С в течение 30–180 мин). После протеолиза к 50 мкл полученного раствора добавляется 450 мкл ESP™-буфера № 2 для достижения нейтрального значения pH и проводится тестирование. При проведении валидации метода определяется время, необходимое для протеолиза по данным электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), дающее максимальный выход по эндотоксинам.

Сотрудниками фирмы Lonza также разработана специальная методика определения содержания БЭ, которая может быть использована как для контроля как препаратов крови, включая альбумин, так и плазмы крови, сыворотки [68]. В случае контроля плазмы должна использоваться плазма после удаления лейкоцитов и тромбоцитов, путем центрифугирования на низких скоростях. Препараты из сыворотки крови, цельная кровь после удаления фибриногена, коагулянтов, клеток крови и т.д. могут быть протестированы тем же способом, что и плазма крови. Процедура пробоподготовки образца включает в себя последовательное выполнение нескольких этапов, таких как (1) разведение образца плазмы или сыворотки в соотношении 1:10 (но не ниже, чем 1:3, так как образцы могут коагулировать при более низких разведениях) с помощью воды для ЛАЛ-теста; (2) инкубирование при 70 °С не менее 15 мин (температура и длительность инкубирования могут подбираться индивидуально); (3) проведение двукратных разведений с помощью воды для ЛАЛ-теста первоначально разведенного (в 10 раз) и проинкубированного (при 70 °С в течение 15 мин) образца.

Некоторые образцы препаратов могут потребовать подбора оптимальных условий – более или менее длительного инкубирования и/или большей или меньшей температуры инкубирования – для получения достоверного коэффициента восстановления положительного контроля испытуемого образца (Positive Product Control recovery, PPC recovery), степени восстановления, отвечающего валидационным критериям по правильности и воспроизводимости (отношение обнаруживаемого количества эндотоксинов к внесенному в %). Допустимые количественные критерии по PPC recovery 50 (75) % приведены в таблице 1 [24]. Приведенные условия инкубирования (15 мин при 70 °С) являются примерными и могут меняться в зависимости от получаемых результатов.

Для самого контроля БЭ в большинстве препаратов крови фирмой Lonza рекомендуется использовать набор Pyrogen-5000, так как при его использовании наблюдается наименьшее влияние мешающих факторов и минимальное искажение результатов анализа. Кинетический набор Kinetic-QCL Assay также может быть использован, однако в этом случае потребуются проводить большие разведения для достижения подобного коэффициента восстановления положительного контроля испытуемого образца. Если анализируемый образец содержит антикоагулянт, такой как гепарин или ЭДТА, то может потребоваться использование раствора MgCl₂ для преодоления хелатирующего эффекта антикоагулянтов [68]. В этом случае первое десятикратное разведение до инкубирования также проводится с помощью воды для ЛАЛ-теста, в то время как последующие двукратные разведения выполняются с помощью 10 мМ раствора MgCl₂. Само проведение ЛАЛ-теста осуществляется согласно инструкции к набору или нормативной документации, стандартной операционной процедуре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для повышения безопасности и конкурентоспособности отечественных препаратов альбумина человека производителям и контролирующим органам необходимо проводить двойной контроль препаратов на пирогены/эндотоксины, а именно осуществлять параллельный контроль пирогенности (*in vivo*) биологическим тестом на кроликах и контроль на бактериальные эндотоксины (*in vitro*) количественным ЛАЛ-тестом (хромогенным или турбидиметрическим) с использованием специальной пробоподготовки, способствующей переводу связанной формы эндотоксинов в свободную, доказанной валидационными протоколами. Это позволит в максимальной степени снизить риск побочных реакций у пациентов, вызванных БЭ/пирогенами, а также гарантировать безопасность по БЭ в течение всего срока годности не только самих препаратов альбумина человека, но также и лекарственных средств, содержащих в своем составе альбумин в качестве стабилизатора.

ЛИТЕРАТУРА

- G. Yamey. Albumin industry launches global promotion // *BMJ*. 2000. V. 320(7234). P. 533.
- T. Zhou et al. Review of the rational use and adverse reactions to human serum albumin in the People's Republic of China // *Patient Prefer Adherence*. 2013. V. 7. P. 1207–1212.
- A.C. Steere, M.K. Rifaat, E.B. Seligmann et al. Pyrogen reactions associated with the infusion of normal serum albumin (human) // *Transfusion*. 1978. V. 18 (1). P. 102–107.
- M.E. Dawson. Interference with the LAL test and how to address it. Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, Massachusetts // *LAL Update*. 2005. V. 22(3). P. 1–6.
- Improved endotoxin detection in protein/peptide and antibody samples using EndoPrep™. EndoPrep™ Application notes – Rev 1 09-11-08 // *BioDtech*. 2008. P. 1-10. URL: <http://www.endotoxin-test.com/endoprep-sample-treatment-proteins-antibodies-peptides/> (дата обращения 22.12.2017).
- Chapter 2.6.8. Pyrogens // *European pharmacopoeia* 8.0. 2013.
- Chapter <151>. Pyrogen Test // *United States Pharmacopeia*. 2011.
- M.E. Weary. A short history of the Limulus amebocyte lysate (LAL) test // *Endo-safe Times*. 2007. V. 13 (1). URL: http://www.biobit.ro/produse/documente/qc_m_m_n_endo_safe_times_august_2010.pdf (дата обращения 17.12.2017).
- E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Sveda et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function // *FASEB J*. 1994. V. 8. P. 217–225.
- V. Liebers, T. Brüning, M. Raulf-Heimsoth. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans // *Am J Ind Med*. 2006. V. 49. P. 474–491.
- E.S. Van Amersfoort, T.J.C. Van Berkel, J. Kuiper. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock // *Clin. Microbiol. Rev*. 2003. V. 16. P. 379–414.
- F.B. Bang. A bacterial diseases of Limulus polyphemus // *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1956. V. 98. P. 325–351.
- J. Levin, F.B. Bang. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin // *Thromb Diath Haemorrh*. 1968. V. 19. P. 186–197.
- J. Levin, F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood // *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1964. V. 115. P. 265–274.
- J. Levin et al. History of the Limulus Lysate Test // *Bacterial endotoxins: structure, biomedical significance, and detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*. – N.Y.: Alan R. Liss, Inc., 1985. P. 3–28.
- А.Г. Ситников, Л.А. Травина, В.А. Багирова. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. – М. 1997. 96 с.
- Licensing of Limulus Amebocyte Lysate, Use as an Alternative for Rabbit Pyrogen Test. 42 FR 57749. November 4, 1977.
- Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test As an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs // *Biological Products and Medical Devices*. U.S. FDA. December 1987/June 2011.
- Chapter <85>. Bacterial Endotoxins Test // *United States Pharmacopeia* 36. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2012. 90 p.
- Chapter <161>. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Device // *United States Pharmacopeia* 36. 2012. 131 p.
- ANSI/AAMI ST72:2011/(R)2016. Bacterial endotoxins – Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing. Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, VA, 2011.
- 3.4. Test for bacterial endotoxins. Document QAS/11.452 FINAL / World Health Organization, July 2012. P. 1–13. URL: http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/Bacterial-endotoxins_QAS11-452_FINAL_July12.pdf (дата обращения 10.12.2017).
- ICH guideline Q4B. Annex 14 to Note for Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial Texts for Use in the ICH Regions on Bacterial Endotoxins Tests – General Chapter. EMA/CHMP/ICH/529785/2010 European Medicines Agency, September 2010, pp. 1-10. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2012/12/WC500136403.pdf (дата обращения 10.12.2017).
- M.E. Dawson. A wealth of options. Choosing an LAL test method. Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, Massachusetts // *LAL Update*. 1995. V. 13 (3). P. 1–6.
- R.L. Górný, J. Douwes, P. Versloot, D. Heederik, J. Dutkiewicz. Application of the classic Limulus test and the quantitative kinetic chromogenic LAL method for evaluation of endotoxin concentration in indoor air // *Ann Agric Environ Med*. 1999. V. 6. P. 45–51.
- Lonza: Limulus Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT®-5000. Cat. № N383, N384, N588, N688. Lonza. – Walkersville. 2007.
- S. Nakamura, T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa, K. Takahashi. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes // *J Biochem*. 1977. V. 81. P. 1567–1569.
- Limulus Amebocyte Lysate CHROMO-LAL for the Detection and Quantitation of Gram-negative Bacterial Endotoxins (Lipopolysaccharides). Associates of Cape Cod, Inc. Cat. № C0031. ACC, Falmouth, 2007.
- S. Iwanaga, T. Morita, T. Harada, S. Nakamura, M. Niwa, K. Takada, T. Kimura, S. Sakakibara. Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme. Its application for the assay of bacterial endotoxins // *Hemostasis* 1978. V. 7. P. 183–188.
- M.J. Devleeschouwer, M.F. Cornil, J. Dony. Studies on the sensitivity and specificity of the Limulus amebocyte lysate test and rabbit pyrogen assays // *Appl Environ Microbiol*. 1985. V. 50. P. 1509–1511.
- Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL. Cat. № 50-650. Cambrex, Walkersville, 2008.
- Chapter 2.6.14. Bacterial endotoxins // *European pharmacopoeia* 8.0, 2013.
- 4.01. Bacterial Endotoxins Test // *Japanese pharmacopoeia* XIV. Chapter 6. P. 20–23.
- Test for Bacterial Endotoxin // *Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume III. Appendix XII*. 2015. P. A120–A124.
- ОФС.1.2.4.0006.15. Бактериальные эндотоксины // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. 2015. URL: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0006-15-bakterialnye-endotoksiny/> (дата обращения 10.12.2017).
- ФС.3.3.2.0006.15. Альбумин человека // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. 2015. URL: <http://pharmacopoeia.ru/fs-3-3-2-0006-15-albumin-cheloveka/> (дата обращения 15.10.2017).

37. Human Albumin solution 01/2013:0255 // European pharmacopoeia 8.0. Chapter 0255, 2013.
38. Monographs Human Albumin // Pharmacopoeia of the people's republic of China. V. III. 2005. P. 175–177.
39. Human albumin. 3.9. Pyrogen test // Minimum requirements for biological products. National institute of infectious diseases Japan. 2006. P. 217–218.
40. J.F. Cooper, J. Levin, H.N. Wagner. Quantitative comparison of *in vitro* and *in vivo* methods for the detection of endotoxin // J. Lab. Clin. Med. 1971. V. 78. P. 138–148.
41. S.M. Wolff. Biological effects of bacterial endotoxins in man // J. Infect. Dis. 1973. V. 128s. P. 251–256.
42. Determination of the bacterial endotoxin in pharmaceutical raw material, finished products and water for injection (WFI) using lysate and control standard endotoxin and bacterial endotoxin test method validation. URL: <https://www.pharmaguideline.com/2011/04/bacterial-endotoxin-test-bet-validation.html> (дата обращения 22.12.2017).
43. Guidance for Industry. Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers, FDA, June 2012. URL: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm31471B.htm> (дата обращения 22.12.2017).
44. Official Control Authority Batch Release of Human Albumin. Guideline for Human Albumin. Human Blood Derived Medical Products / Council Directive 2001/83/EC formerly 89/381/EEC, amended by Directive 2004/27/EC, EDQM, 2012.
45. Technical Guide for the Elaboration and Use of Monographs on Human Plasma-derived Products // European Pharmacopoeia. EDQM, 2015.
46. Overview of Comments Received on the Guideline on the Replacement of Rabbit Pyrogen Testing by an Alternative Test for Plasma Derived Medical Products (EMA/CHMP/BWP/452081/2007).
47. Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation / Ed. by K.L. Williams. – Boca Raton: CRC Press, 2007. 440 p.
48. T.J. Joiner, P.F. Kraus, T.C. Kupiec. Comparison of endotoxin testing methods for pharmaceutical products // International Journal of Pharmaceutical Compounding. 2002. V. 6. № 6. P. 408–409.
49. A. Gardi, G. Arpagaus. The Limulus Amebocyte lysate test, a useful tool for the control of plasma fractions // Develop. Biol. Standard. 1977. V. 34. P. 21–26.
50. H.D. Hochstein, E.G. Seligmann, R.B. Marquina, E. Rivera. Limulus Amebocyte lysate testing in normal serum albumin (human) // Develop. Biol. Standard. 1979. V. 44. P. 35–52.
51. J. Levin, P.A. Tomasulo, R.S. Oser. Detection of endotoxemia in human blood and demonstration of an inhibitor // J. Lab. Clin. Med. 1970. V. 75. P. 903–911.
52. R.C. Skames, N.Y. Ann. The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum // Acad. Sci. 1966. V. 133. P. 644–662.
53. Guideline on the Replacement of Rabbit Pyrogen Testing by an Alternative Test for Plasma Derived Medicinal Products. Committee for Medicinal Products for Human Use. European Medicines Agency. Doc. Ref. EMA/CHMP/BWP/452081/2007. – London. 2009.
54. S.A. David, P. Balaram, V.I. Mathan. Characterization of the interaction of lipid A and lipopolysaccharide with human serum albumin: implications for an endotoxin carrier function for albumin // Journal of Endotoxin Research. 1995. V. 2. № 2. P. 99–106.
55. R. Elin, S. Wolff. Nonspecificity of the Limulus Amebocyte Lysate test: Positive reactions with polynucleotides and proteins // J. Infect. Diseases. 1973. V. 128. P. 349–352.
56. P.F. Rolansky, T.J. Novitsky. Sensitivity of Limulus Amebocyte Lysate (LAL) to LAL-reactive glucans // J. Clinical microbiology. 1991. V. 29. P. 2477–2483.
57. A. Kakinuma, T. Asano, H. Torri, Y. Sugino. Gelation of Limulus amebocyte lysate by an antitumor (1→3)-β-D-glucan // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 101. P. 434–439.
58. А.В. Карякин. Отечественные препараты крови и проблемы соответствия международным требованиям // Гематология и трансфузиология. 2012. № 3. Приложение. С. 112–113.
59. Beta-G-Blocker Kit Cat. № N190. Lonza, Walkersville, 2013. URL: http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_B-G-Blocker_Product_Insert.pdf (дата обращения 15.12.2017).
60. T. Obayashi. Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate: comparison with conventional procedures and clinical applications // J. Lab. Clin. Med. 1984. V. 104(3). P. 321–330.
61. O. Westphal, O. Luderitz, F. Blister. Extraction of bacteria with phenol/water // Naturforsch. B: Anorg. Chem. Org. Chem. Biochem. Biophys. Biol. 1952. V. 7B. P. 148–155.
62. R.I. Roth, F.C. Levin, J. Levin. Optimization of detection of bacterial endotoxin in plasma with the Limulus test // J. Lab. Clin. Med. 1990. V. 116(2). P. 153–161.
63. J.A. Rudbach, K.C. Milner. Reaction of endotoxin and surfactants. III, Effect of sodium lauryl sulfate on the structure and pyrogenicity of endotoxin // Canadian J. of Microbiol. 1968. V. 14. P. 1173–1178.
64. K.J. Sweadner, M. Forte, L.L. Nelson. Filtration removal of endotoxins (pyrogens) in solution in different states of aggregation // J. Applied and Environmental Microbiology. 1977. P. 382–385.
65. Medical Devices and LAL Testing. Associates of Cape Cod, Inc. Hong Kong, 2008. URL: http://www.service.hkpc.org/bme2008/CPD_Activities/Powerpoint_LAL.pdf (дата обращения 15.12.2017).
66. Rapid Micro Methods PTS – LAL. Endosafe Products and services. Charles river laboratories. P. 1–36. URL: <https://www.yumpu.com/en/document/view/31599122/rapid-micro-methods-pts-a-lal-cvg> (дата обращения 22.12.2017).
67. Pyrospense™ (dispersing agent). Cat. № N188. Lonza, Walkersville, 2014. URL: http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_PYROSPERSE_Product_Insert.pdf (дата обращения 15.12.2017).
68. Lonza Manuals Product Instructions. Serum Plasma Testing with PYROGENT-5000 and Kinetic-QCL Assays. Technical Tips. URL: <http://www.phmb.com/campaigns/pharmabiotech/linkedin-qc-sst/qc-tech-tip-serum-plasma.aspx> (дата обращения 22.12.2017).
69. Accurate Endotoxin Detection in Human Plasma With ESP™. Endotoxin Sample Preparation (ESP™) Kit // ESP™ Application Notes. BioDtech, Inc. 2014. Rev 2 11-13-14. P. 1–9. URL: <http://biodtechinc.com/wp-content/uploads/2014/09/ESP-Application-Note.pdf> (дата обращения 17.12.2017).
70. Patent US № 8921063 B2. Enhancing endotoxin detection / M.G. Pepe, M.K. Champion.