

Общие фармакопейные статьи, включенные в первый том Государственной фармакопеи Республики Беларусь (второе издание) «Общие методы контроля качества лекарственных средств». Общие тексты. Экстемпоральные лекарственные средства

УТВЕРЖДЕНО

Приказ
Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
25.04.2012 № 453

Общие фармакопейные статьи, включенные в первый том Государственной фармакопеи Республики Беларусь (второе издание) «Общие методы контроля качества лекарственных средств»

Методы анализа (2.1–2.7)

Методы анализа (2.8–2.9)

Контейнеры. Реактивы

5. ОБЩИЕ ТЕКСТЫ

5.1. ОБЩИЕ ТЕКСТЫ ПО МИКРОБИОЛОГИИ

01/2013:50101

5.1.1. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

Под стерильностью понимают отсутствие жизнеспособных микроорганизмов. Стерильность продукции не может гарантироваться испытанием; она должна обеспечиваться производственным процессом, валидированным надлежащим образом. Важно, чтобы при изучении воздействия выбранной процедуры стерилизации на продукт (включая контейнер и упаковку) была подтверждена ее эффективность, а также сохранение продукта. Рекомендуется выбирать такой контейнер, чтобы иметь возможность использовать оптимальный режим стерилизации. Малейшее нарушение валидированного процесса стерилизации влечет за собой риск получения нестерильного или некачественного продукта. Повторную валидацию следует проводить каждый раз при внесении изменений в процедуру стерилизации, в том числе при изменении объема продукта, стерилизуемого за один раз. При проектировании производственного процесса следует учитывать принципы надлежащей производственной практики (*GMP*), в том числе:

- привлечение квалифицированного персонала с соответствующей подготовкой;
- использование соответствующих помещений;
- использование соответствующего производственного оборудования, сконструированного таким образом, чтобы его можно было легко чистить и стерилизовать;
- применение соответствующих мер для сведения к минимуму биологических загрязнений до стерилизации;
- использование валидированных процедур на всех важнейших этапах производства;
- мониторинг производственной среды и процесса производства.

Предосторожности, необходимые для снижения биологической контаминации перед стерилизацией, включают использование компонентов с низкой степенью контаминации микроорганизмами. По отношению к составляющим, которые могут быть потенциально контаминированными в силу их происхождения, природы или способа подготовки, желателен мониторинг микробиологического мониторинга и установление допустимых пределов микробного загрязнения.

Методы, описанные ниже, применимы главным образом к инактивации или удалению бактерий, дрожжей и плесневых грибов. Для биологической продукции животного или человеческого происхождения или в случаях, когда в производственном процессе участвовал такой материал, необходимо продемонстрировать во время валидации, что процесс способен удалить или инактивировать соответствующую вирусную контаминацию.

По возможности следует выбирать процесс, при котором продукция стерилизуется в контейнере (конечная стерилизация). При использовании полностью валидированного метода конечной стерилизации – стерилизации паром, горячим воздухом или ионизирующим излучением – по согласованию с соответствующим компетентным уполномоченным органом допускается параметрический выпуск серии стерильного продукта, при котором заключение о качестве серии принимается на основании данных о процессе стерилизации, а не результатов испытания на стерильность.

В тех случаях, когда конечная стерилизация невозможна, используют фильтрацию через фильтры, способные задержать бактерии, или производство в асептических условиях. По возможности при этом следует проводить дополнительную обработку продукта (например, нагревание) в контейнере. Во всех случаях контейнер и укупочное средство должны обеспечивать стерильность продукта на протяжении всего срока годности.

Уровень гарантии стерильности (*SAL – Sterility Assurance Level*)

В тех случаях, когда это возможно, для методов, приведенных ниже, указывают «уровень гарантии стерильности» (*SAL*). Невозможно доказать, что стерильность достигнута для каждой из множества единиц, подвергнутых стерилизации. Инактивация микроорганизмов физическими или химическими методами подчиняется экспоненциальному закону, следовательно, всегда существует конечная статистическая вероятность того, что микроорганизм может выжить в процессе стерилизации. Для каждого конкретного процесса вероятность выживания определяется количеством, типом и сопротивляемостью присутствующих микроорганизмов и средой, в которой находятся организмы во время обработки. *SAL* процесса стерилизации представляет собой степень гарантии того, что процесс, о котором идет речь, обеспечивает стерильность группы продукции. *SAL* конкретного процесса выражается как вероятность наличия нестерильного продукта в этой группе. Например, $SAL = 10^{-6}$ означает вероятность наличия не более одного жизнеспособного микроорганизма в $1 \cdot 10^6$ стерилизованных единиц конечной продукции. *SAL* процесса стерилизации для конкретного продукта устанавливается в ходе надлежащего процесса валидации.

МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация может быть проведена одним из описанных ниже методов. Возможно использование модификаций или комбинаций этих методов при условии проведения валидации выбранной процедуры стерилизации как в отношении эффективности, так и в отношении целостности продукта, в том числе контейнера или упаковки. Для всех методов стерилизации ведется наблюдение за важнейшими стадиями процесса для того, чтобы подтвердить, что установленные ранее необходимые условия стерилизации выдерживаются для всей серии продукции на протяжении всего процесса стерилизации. Это применимо во всех случаях, включая случаи использования стандартных условий.

КОНЕЧНАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

При конечной стерилизации очень важно учитывать неоднородность физических и, где это уместно, химических условий внутри стерилизационной камеры. Для каждого варианта загрузки каждого типа и размера контейнера или упаковки следует определить положение в стерилизационной камере, которое наименее доступно для стерилизующего фактора (например, самое холодное место в автоклаве). Для подтверждения того, что все загрузки проходят предусмотренную обработку равным образом, необходимо определить минимальную летальность микроорганизмов в ходе стерилизационного цикла и подтвердить воспроизводимость цикла.

После окончательного выбора режима конечной стерилизации необходимо, где это возможно, собирать сведения о качестве процесса в повседневном использовании при

помощи мониторинга и ведения записей о физических и, если это уместно, химических условиях, полученных в камере при каждом стерилизационном цикле.

Паровая стерилизация (автоклавирование). Стерилизация насыщенным паром под давлением, где это возможно, в особенности для готовых лекарственных средств в виде водных растворов. Стандартные условия при таком методе конечной стерилизации готовых лекарственных средств в виде водных растворов следующие: прогревание при температуре не менее 121 °С в течение 15 мин. Допускается использование других сочетаний времени и температуры, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов в рамках установленных допусков. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать *SAL* не более 10^{-6} . Рекомендации по проведению валидации с использованием F_0 концепции приведены ниже (5.1.5). В ходе процесса стерилизации следует регистрировать физические условия (температура и давление) в автоклаве. Температуру, как правило, измеряют при помощи датчиков температуры, помещенных в контрольный контейнер. Дополнительные термоэлементы помещают в области загруженной камеры с наименьшей температурой (определенные предварительно). Условия в каждом цикле стерилизации должны соответствующим образом регистрироваться, например, в виде температурно-временной диаграммы или другим способом.

Если предусмотрена биологическая оценка, ее проводят с использованием подходящих биологических индикаторов (5.1.2).

Сухожаровая стерилизация (стерилизация горячим воздухом). Для данного метода конечной стерилизации стандартными условиями являются: прогревание при температуре не менее 160 °С в течение не менее 2 часов. Допускается использование других сочетаний времени и температуры, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов в рамках установленных допусков. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать *SAL* не более 10^{-6} .

Сухожаровая стерилизация проводится в сухожаровом шкафу, оснащенном устройством для принудительной циркуляции воздуха, или при помощи другого оборудования, специально предназначенного для этой цели. Стерилизатор загружают таким образом, чтобы обеспечить однородность температуры в пределах всей загрузки. Температуру, как правило, измеряют при помощи датчиков температуры, помещенных в контрольный контейнер. Дополнительные термоэлементы помещают в области загруженной камеры с наименьшей температурой (определенные предварительно). В ходе каждого цикла стерилизации регистрируют температуру подходящим способом.

Если предусмотрена биологическая оценка, ее проводят с использованием подходящих биологических индикаторов (5.1.2).

Сухожаровая стерилизация при температуре более 220 °С часто используются для стерилизации и депирогенизации изделий из стекла. В этом случае в качестве замены биологическим индикаторам может быть доказано снижение термостойких бактериальных эндотоксинов на три порядка (5.1.2).

Радиационная стерилизация. Стерилизация этим методом достигается при помощи воздействия на продукт ионизирующего излучения в форме гамма-излучения от соответствующего радиоизотопного источника (такого как кобальт-60) или пучка электронов, подаваемого соответствующим ускорителем электронов.

В некоторых странах существуют распоряжения, регламентирующие использование ионизирующего излучения для стерилизации, например, в соответствующих Руководящих указаниях Европейского Сообщества.

Для этого метода конечной стерилизации стандартная поглощенная доза составляет 25 кГр. Допускается использование других доз, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов в рамках установленных допусков. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать *SAL* не более 10^{-6} .

В процессе стерилизации следует постоянно осуществлять измерения поглощенного продуктом излучения при помощи установленных дозиметрических методов, не зависящих от доз. Дозиметры должны проходить калибровку по отношению к стандартному

источнику на эталонной радиационной установке непосредственно после получения от поставщика, а затем через определенные промежутки времени с периодичностью не реже одного раза в год.

Если предусмотрена биологическая оценка, ее проводят с использованием подходящих биологических индикаторов (5.1.2).

Газовая стерилизация. Этот метод стерилизации может использоваться только в случае, если нет подходящей альтернативы. При этом должно быть обеспечено проникновение газа и влаги в стерилизуемый продукт, а также последующее удаление газа способом, позволяющим снизить концентрацию газа и продуктов его превращения в стерилизуемом продукте до уровня, не вызывающего токсических эффектов при использовании продукта. Соответствующие рекомендации относительно использования этиленоксида приводятся, например, в Руководящих указаниях Европейского Сообщества.

Там, где это возможно, необходимо в ходе стерилизации вести измерение и регистрацию концентрации газа, относительной влажности, температуры и продолжительности процесса. Измерения проводятся там, где наименее вероятно достижение условий стерилизации, как установлено при валидации.

Эффективность процесса для каждой загрузки проверяется с помощью использования подходящего биологического индикатора (5.1.2). Перед выпуском каждой серии необходимо проводить контроль стерильности на соответствующем количестве образцов (2.6.1).

[#]Проведение данного вида стерилизации возможно в следующих условиях:

– окись этилена – стерилизующая доза 1200 мг/дм³, температура стерилизации не менее 18 °С, относительная влажность 80 %, время стерилизационной выдержки – 16 ч (портативный аппарат);

– смесь ОБ (смеси окиси этилена и бромистого метила в весовом соотношении (1:2,5):

а) стерилизующая доза 2000 мг/дм³, температура стерилизации 55 °С, относительная влажность 80 %, время стерилизационной выдержки – 4 ч;

б) стерилизующая доза 2000 мг/дм³, температура стерилизации не менее 18 °С, относительная влажность 80 %, время стерилизационной выдержки – 16 ч при той же относительной влажности (портативный аппарат).

Допускается использование других режимов газовой стерилизации, обеспечивающих стерильность и сохранность объекта. Режим должен быть обоснован и указан в нормативной документации.

Стерилизуемые изделия упаковываются в пакеты из полиэтиленовой пленки толщиной от 0,06 мм до 0,2 мм, пергаменты и др. Метод рекомендован для изделий из резины, полимерных материалов, стекла, металла.

В связи с токсичностью окиси этилена и бромистого метила применение стерилизованных этими газами изделий допускается только после их дегазации, т.е. выдержки в вентилируемом помещении до допустимых остаточных количеств, указанных в нормативной документации.

Условия дегазации зависят от назначения, способа применения, размеров изделий и упаковки и указываются в нормативной документации на изделие.[#]

ФИЛЬТРАЦИЯ

Некоторые активные ингредиенты и продукты, которые не подлежат конечной стерилизации, могут быть подвергнуты процедуре фильтрации через фильтры, пригодность которых предварительно доказана путем микробиологических испытаний с использованием подходящих тест-микроорганизмов, например, *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091, CIP 103020, [#]CCM 4623[#]). При испытании рекомендуется использовать концентрацию микроорганизмов не менее 10⁷ КОЭ/см² активной поверхности фильтра и приготовление суспензии в триптон-соевом бульоне, который после прохождения через фильтр собирается асептическим способом и инкубируется аэробно при температуре 32 °С. Такая процедура требует соблюдения мер предосторожности. Организация производственного процесса и состояние окружающей среды должны сводить к минимуму риск микробного загрязнения, их следует регулярно подвергать надлежащему мониторингу. Оборудование, контейнеры, укупорочные средства и, где это возможно,

ингредиенты должны подвергаться надлежащей стерилизации. Рекомендуется проводить процесс фильтрации непосредственно перед стадией наполнения контейнера. Операции, которые следуют за стадией фильтрации, необходимо проводить в асептических условиях. Растворы пропускают через мембранные фильтры (с номинальным размером пор не более 0,22 мкм), способные задерживать бактерии, или через фильтры других типов, не уступающие им по эффективности. Необходимо предпринимать надлежащие меры для предотвращения потерь растворенного вещества в результате адсорбции на фильтре, а также высвобождения удержанных фильтром загрязнений. Следует учитывать уровень биозагрязнений до начала фильтрации, пропускную способность фильтра, объем серии и продолжительность фильтрации. Фильтр не должен использоваться в течение более длительного времени, чем утверждено при валидации данного фильтра в сочетании с конкретным фильтруемым лекарственным средством.

Целостность собранного стерилизующего фильтра должна проверяться перед использованием и подтверждаться после использования путем проведения испытаний, соответствующих типу используемого фильтра и этапу испытания, например, испытания на определение насыщения, на удержание давления или скорости диффузии.

Так как метод стерилизующей фильтрации имеет дополнительные потенциальные факторы риска по сравнению с другими процессами стерилизации, рекомендуется проводить предварительную фильтрацию через удерживающий бактерии фильтр в тех случаях, когда низкий уровень биозагрязнений не может быть обеспечен другими средствами.

ПРОИЗВОДСТВО В АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Целью производства в асептических условиях является сохранение стерильности продукта, изготовленного из компонентов, каждый из которых был предварительно стерилизован одним из методов, описанных выше. Это достигается путем использования условий и оборудования, предназначенных для предотвращения микробного загрязнения. В асептических условиях могут осуществляться такие стадии производственного процесса, как наполнение контейнеров и укупорка, смешивание ингредиентов с последующим асептическим наполнением и асептической укупоркой.

Для сохранения стерильности компонентов состава и готового лекарственного средства в ходе производственного процесса особое внимание следует уделять:

- состоянию производственной среды;
- персоналу;
- критическим поверхностям;
- стерилизации контейнеров/укупорочных средств и передаточным процедурам;
- предельному времени хранения лекарственного средства до наполнения контейнера.

Валидация процесса включает надлежащую проверку всего вышеперечисленного, а также систематический контроль при помощи имитационных испытаний с использованием питательной среды, которую инкубируют и исследуют на наличие микробного загрязнения (испытания на заполнение питательными средами). Кроме того, перед выпуском серии любого лекарственного средства, стерилизованного методом фильтрации или изготовленного в асептических условиях, следует проводить испытание на стерильность для соответствующего количества образцов (2.6.1).

01/2013:50102

5.1.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Биологические индикаторы представляют собой стандартизованные препараты определенных микроорганизмов, используемые для оценки эффективности процедуры стерилизации. Они обычно представляют собой популяцию спор бактерий, нанесенных на подходящий инертный носитель. Инокулированный носитель изолируют таким образом, чтобы предотвратить его повреждение или загрязнение, но в то же время обеспечить контакт стерилизующего агента с микроорганизмами. Суспензии спор могут находиться в герметично закрытых ампулах. Биологические индикаторы готовят таким образом, чтобы

существовала возможность их хранения при определенных условиях, при этом должен быть указан срок годности.

Микроорганизмы того же вида, что и бактерии, используемые в производстве биологических индикаторов, могут инокулироваться непосредственно в жидкий продукт, предназначенный для стерилизации, или в жидкий продукт, аналогичный тому, который предназначен для стерилизации. В этом случае необходимо доказать, что жидкий продукт не оказывает ингибирующего воздействия на используемые споры, особенно на их прорастание.

Биологический индикатор должен иметь следующие характеристики: название вида бактерий, используемых в качестве эталонных микроорганизмов, номер штамма в исходной коллекции, количество жизнеспособных спор, приходящееся на носитель, и величину D . Величина D – параметр стерилизации (продолжительность или поглощенная доза), обеспечивающий снижение числа жизнеспособных микроорганизмов до 10 % от исходного числа. Данная величина имеет смысл для точно определенных экспериментальных условий стерилизации. Биологический индикатор может содержать несколько видов бактерий на одном носителе. Должна быть указана информация о необходимой питательной среде и условиях инкубации.

Индикаторы рекомендуется размещать в областях, наименее доступных для стерилизующего агента. Эти области определяют эмпирически или на основании предварительных физических измерений, если это возможно. Можно использовать биологические индикаторы, которые включают ампулу с питательной средой, помещенную в упаковку, защищающую инокулированный носитель.

Выбор тест-микроорганизмов для биологических индикаторов должен проводиться с учетом следующих требований:

а) сопротивляемость тест-штамма должна быть пригодной для конкретного метода стерилизации и должна быть более высокой по сравнению с сопротивляемостью микроорганизмов, потенциально контаминирующих продукт;

б) тест-штамм не должен быть патогенным;

с) тест-штамм должен легко культивироваться.

Наличие после инкубации роста эталонных микроорганизмов, подвергшихся процедуре стерилизации, указывает на то, что эта процедура неудовлетворительна.

Паровая стерилизация. Для валидации циклов стерилизации рекомендуется использование биологических индикаторов, предназначенных для стерилизации паром. Рекомендуются споры *Geobacillus stearothermophilus* (например, ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 или CIP 52.81) или иных штаммов микроорганизмов, имеющих эквивалентные характеристики. Число жизнеспособных спор должно превышать $5 \cdot 10^5$ на носитель. Величина D при температуре 121 °C должна составлять не менее 1,5 мин. При обработке биологических индикаторов паром при температуре (121 ± 1) °C в течение 6 мин должно наблюдаться сохранение жизнеспособных спор, а обработка при той же температуре в течение 15 мин должна приводить к полной гибели эталонных тест-микроорганизмов.

Сухожаровая стерилизация. Для приготовления биологических индикаторов рекомендованы споры *Bacillus atrophaeus* (например, ATCC 9372, NCIMB 8058 или CIP 77.18) или иных штаммов микроорганизмов, имеющих эквивалентные характеристики. Число жизнеспособных спор должно быть более $1 \cdot 10^6$ на носитель. Величина D при температуре 160 °C должна составлять не менее 2,5 мин. Для стерилизации и депирогенизации стеклянной посуды часто используется горячий воздух при температуре более 220 °C. В этом случае в качестве замены биологическим индикаторам может быть доказано снижение термостойких бактериальных эндотоксинов на три порядка.

Радиационная стерилизация. Биологические индикаторы могут применяться для мониторинга текущих операций в качестве дополнительной возможности оценки эффективности установленной дозы излучения, особенно в случае стерилизации ускоренными электронами. Рекомендуются споры *Bacillus pumilus* (например, ATCC 27142, NCTC 10327, NCIMB 10692 или CIP 77.25) или иных штаммов микроорганизмов, имеющих эквивалентные характеристики. Число жизнеспособных спор должно быть более $1 \cdot 10^7$ на носитель. Величина D должна составлять не менее 1,9 кГр. Необходимо убедиться, что

после облучения биологического индикатора дозой 25 кГр (минимальная поглощенная доза) не наблюдается роста эталонных микроорганизмов.

Газовая стерилизация. Для всех процедур газовой стерилизации необходимо использование биологических индикаторов – как для валидации циклов, так и для каждодневной работы. Газовая стерилизация широко применяется для стерилизации медицинских приспособлений, изоляторов, камер и др., но такое использование не рассматривается в рамках Фармакопеи. Для этиленоксида рекомендуется использовать споры *Bacillus atrophaeus* (например, ATCC 9372, NCIMB 8058 или CIP 77.18) или иных штаммов микроорганизмов, имеющих эквивалентные характеристики, # для перекиси водорода и перуксусной кислоты – споры *Geobacillus stearothermophilus* (например, ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 или CIP 52.81)#. Число жизнеспособных спор должно быть более $1 \cdot 10^6$ на носитель. Для каждой конкретной процедуры должны быть известны параметры сопротивляемости тест-микроорганизма, например, для этиленоксида величина *D* должна составлять не менее 2,5 мин для цикла стерилизации со следующими параметрами: концентрация этиленоксида 600 мг/л, температура 54 °С и относительная влажность 60 %. Следует убедиться, что после 25-минутного цикла стерилизации с указанными параметрами рост эталонных микроорганизмов не наблюдается, тогда как после 50-минутного цикла при более низкой температуре (600 мг/л, 30 °С, относительная влажность 60 %) жизнеспособность спор сохраняется.

01/2013:50103

5.1.3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ КОНСЕРВАНТОВ

Если лекарственное средство само по себе не обладает антимикробной активностью, в его состав могут быть введены антимикробные консерванты, в особенности в готовые лекарственные средства в виде водных растворов для предотвращения размножения или ограничения контаминации микроорганизмами, которая может произойти с продуктами при нормальных условиях хранения и использования, особенно с контейнерами на большое количество доз, и которая может представлять опасность для пациента. Антимикробные консерванты не должны применяться в качестве альтернативы Надлежащей производственной практики (GMP).

Эффективность антимикробных консервантов может усиливаться или ослабляться в результате взаимодействия с действующим веществом или другими компонентами готового лекарственного средства, а также с упаковочными или укупорочными материалами. Поэтому на протяжении срока годности следует контролировать антимикробную активность готового лекарственного средства, хранящегося в контейнере, с целью доказательства того, что она не снижается в процессе хранения. Такие исследования должны проводиться на образцах, извлеченных из контейнера непосредственно перед испытанием.

На стадии разработки лекарственного средства необходимо доказать, что антимикробная активность самого лекарственного средства или, при необходимости, лекарственного средства с консервантом обеспечивает надлежащую защиту от нежелательных воздействий, которые могут быть результатом микробного загрязнения лекарственного средства или размножения в нем микроорганизмов в процессе хранения или использования.

Эффективность антимикробной активности может быть продемонстрирована при помощи приведенного ниже испытания. Данное испытание не предназначено для использования в целях повседневного контроля.

ИСПЫТАНИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ КОНСЕРВАНТОВ

Испытание состоит во внесении в готовое лекарственное средство, по возможности находящееся в контейнере, необходимого количества подходящих микроорганизмов и хранении инокулированного образца при указанной ниже температуре, извлечении проб из инокулированных образцов через определенный промежуток времени и определении в нем числа микроорганизмов.

Эффективность консерванта в готовом лекарственном средстве считают удовлетворительной, если в условиях проведения испытаний при хранении инокулированных образцов при заданной температуре в течение указанных промежутков времени наблюдается значительное уменьшение числа микроорганизмов. Критерии оценки, показывающие уменьшение числа микроорганизмов за определенный период времени, зависят от требуемой степени защиты готового лекарственного средства (таблицы 5.1.3.-1–5.1.3.-3).

Тест-микроорганизмы

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027; NCIMB 8626; CIP 82.118; #ГИСК 453#

Staphylococcus aureus ATCC 6538; NCTC 10788; NCIMB 9518; CIP 4.83; #ATCC 6538-P (FDA 209-P)#

Candida albicans ATCC 10231; NCPF 3179; IP 48.72; #ATCC-885-653#

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404; IMI 149007; IP 1431.83; #ВКМФ-1119; ВКПМ F-824#

Необходимо применять один штамм бактерий, выбранные микроорганизмы могут дополняться другими штаммами или видами, которые могут представлять вероятное микробное загрязнение для лекарственного средства. Например, *Escherichia coli* (ATCC 8739; NCIMB 8545; CIP 53.126; #ATCC 25922#) используется при испытании всех лекарственных средств для орального применения, а *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381; IP 2021.92) – для лекарственных средств для орального применения с высокой концентрацией сахара.

Подготовка посевного материала

Предварительно перед испытанием свежевыращенную исходную культуру каждого микроорганизма из указанных тест-микроорганизмов пересевают на поверхность агаризованной среды на основе гидролизата казеина и соевых бобов (2.6.12) в случае выращивания бактерий или декстрозного агара Сабуро без добавления антибиотиков (2.6.12) в случае выращивания грибов. Культуры бактерий инкубируют при температуре 30 °С – 35 °С в течение 18–24 ч; культуру *C. albicans* инкубируют при температуре 20 °С – 25 °С в течение 48 ч и культуру *A. brasiliensis* – при температуре 20 °С – 25 °С в течение 7 дней или до получения хорошо развитых спор. Для получения чистой культуры микроорганизмов могут потребоваться пересевы, однако рекомендуется ограничиться их минимально возможным числом.

Для приготовления суспензии бактериальных культур и культуры *C. albicans* микробную массу смывают с питательной среды стерильной суспендирующей жидкостью, содержащей 9 г/л натрия хлорида Р, и переносят в подходящий сосуд. Затем с помощью той же жидкости доводят содержание микроорганизмов до 10⁸ в миллилитре. Для приготовления суспензии культуры *A. brasiliensis* используют стерильную суспендирующую жидкость, содержащую 0,9 г/л хлорида натрия Р и 0,5 г/л полисорбата 80 Р, и с ее помощью доводят содержание спор до приблизительно 10⁸ в одном миллилитре.

Из каждой суспензии немедленно отбирают подходящий образец и определяют число колониеобразующих единиц в 1 мл (КОЭ/мл) каждой суспензии методом прямого посева на чашки или методом мембранной фильтрации (2.6.12). Полученное значение служит для определения числа жизнеспособных микроорганизмов в инокуляте и сходного числа микроорганизмов при проведении испытания. Инокулят следует использовать немедленно после приготовления.

МЕТОДИКА

Для подсчета жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах используют ту же плотную питательную среду, которая была использована для первоначального выращивания соответствующих микроорганизмов.

Необходимо инокулировать каждый из контейнеров с испытуемым лекарственным средством суспензией одного из тест-микроорганизмов до концентрации 10⁵–10⁶ КОЭ в 1 мл или 1 г лекарственного средства. Объем суспензии должен составлять не более 1 % от объема образца. Образец тщательно перемешивают для обеспечения равномерного распределения микроорганизмов.

Инокулированные образцы лекарственного средства выдерживают при температуре 20 °С – 25 °С в защищенном от света месте. Из каждого испытуемого образца отбирают пробы (обычно 1 мл или 1 г) непосредственно после инокуляции и через подходящие интервалы времени в соответствии с типом лекарственного средства и определяют число жизнеспособных микроорганизмов методом посева на чашки или методом мембранной фильтрации (2.6.12). Антимикробную активность готового лекарственного средства следует устранить путем разведения, фильтрации или с помощью подходящего инактиватора. При использовании разведения надлежащим образом учитывают уменьшение чувствительности при обнаружении малых количеств живых микроорганизмов. При использовании инактиватора следует подтвердить путем контрольных опытов, что его присутствие не влияет на жизнеспособность микроорганизмов.

Следует подтвердить пригодность методики для доказательства требуемого снижения числа жизнеспособных микроорганизмов.

КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

Критерии оценки антимикробной активности приведены в таблицах 5.1.3.-1–5.1.3.-3 в виде логарифмического уменьшения числа жизнеспособных микроорганизмов относительно значения, полученного для инокулята.

Таблица 5.1.3.-1

Лекарственные средства для парентерального, офтальмологического, внутриматочного и интрамаммарного применения

		lg уменьшение				
		6 ч	24 ч	7 сут.	14 сут.	28 сут.
Бактерии	A	2	3	–	–	НВ
	B	–	1	3	–	НУ
Грибы	A	–	–	2	–	НВ
	B	–	–	–	1	НУ

НВ – нет выявления.

НУ – нет увеличения живых микроорганизмов по сравнению с предыдущим снятием показаний.

Критерий А соответствует рекомендованной эффективности. Если обосновано, что критерий А не может быть достигнут, например, по причине повышенного риска неблагоприятных воздействий, лекарственное средство должно удовлетворять критерию В.

Таблица 5.1.3.-2

Лекарственные средства для ушного, назального, местного применения, ингаляционные лекарственные средства

		lg уменьшение			
		2 сут.	7 сут.	14 сут.	28 сут.
Бактерии	A	2	3	–	НУ
	B	–	–	3	НУ
Грибы	A	–	–	2	НУ
	B	–	–	1	НУ

НУ – нет увеличения живых микроорганизмов по сравнению с предыдущим снятием показаний.

Критерий А соответствует рекомендованной эффективности. Если обосновано, что критерий А не может быть достигнут, например, по причине повышенного риска неблагоприятных воздействий, лекарственное средство должно удовлетворять критерию В.

Таблица 5.1.3.-3

Лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта, для орального, ректального применения

	lg уменьшение	
	14 сут.	28 сут.
Бактерии	3	НУ
Грибы	1	НУ

НУ – нет увеличения живых микроорганизмов по сравнению с предыдущим снятием показаний.

Приведенные критерии соответствуют рекомендованной эффективности.

01/2013:50104

5.1.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА НЕСТЕРИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Присутствие некоторых микроорганизмов в нестерильных лекарственных средствах потенциально может уменьшить терапевтическую активность продукта или даже инактивировать его, кроме этого существует возможность неблагоприятного воздействия на организм пациента. Поэтому производители должны обеспечить выполнение действующего руководства по Надлежащей производственной практике при производстве, хранении и распространении лекарственных средств для гарантирования их низкой биологической загрязненности.

Микробиологическое испытание нестерильных лекарственных средств проводят в соответствии с методами, приведенными в общих статьях 2.6.12 и 2.6.13. Критерии приемлемости для нестерильных лекарственных средств, базирующиеся на общем количестве аэробов (ОКА) и на общем количестве грибов (ОКГ), приведены в таблицах 5.1.4.-1 и 5.1.4.-2. Критерии приемлемости основываются на отдельных результатах или на средних результатах параллельных подсчетов в случае их проведения (например, в методах чашечного подсчета).

Таблица 5.1.4.-1

Критерии приемлемости для микробиологической чистоты нестерильных лекарственных средств

Способ применения	Общее количество аэробов (ОКА), КОЕ/г или КОЕ/мл	Общее количество грибов (ОКГ), КОЕ/г или КОЕ/мл	Специфицированные микроорганизмы
Неводные лекарственные средства для внутреннего применения	10^3	10^2	Отсутствие <i>Escherichia coli</i> (1 г или 1 мл)
Водные лекарственные средства для внутреннего применения	10^2	10^1	Отсутствие <i>Escherichia coli</i> (1 г или 1 мл)
Ректальный	10^3	10^2	–
Для использования на слизистой оболочке ротовой полости Для десенного использования Для кожного использования Для назального использования Для ушного использования	10^2	10^1	Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> (1 г или 1 мл) Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 г или 1 мл)
Для вагинального применения	10^2	10^1	Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 г или 1 мл) Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> (1 г или 1 мл) Отсутствие <i>Candida albicans</i> (1 г или 1 мл)
Трансдермальные пластыри (на один пластырь, включая	10^2	10^1	Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> (1 г или 1 мл)

клейкую поверхность и подложку)			Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 г или 1 мл)
Для ингаляционного применения (для лекарственных средств для распыления применяются специальные требования)	10 ²	10 ¹	Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> (1 г или 1 мл) Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 г или 1 мл) Отсутствие грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи (1 г или 1 мл) #либо отсутствие бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> (1 г или 1 мл) при испытании в соответствии с альтернативной методикой определения#
Специальные меры предосторожности Фармакопеи для готовых лекарственных средств для орального применения, в состав которых входят фармацевтические субстанции и вспомогательные вещества природного (животного, растительного или минерального) происхождения, для которых предварительная антимикробная обработка невозможна и в отношении которых компетентный уполномоченный орган допускает микробное загрязнение исходного материала более 10 ³ жизнеспособных микроорганизмов в 1 г или в 1 мл	10 ⁴	10 ²	Не более 10 ² КОЕ грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи (1 г или 1 мл) #либо не более 10 ² КОЕ бактерий семейства <i>Enterobacteriaceae</i> (1 г или 1 мл) при испытании в соответствии с альтернативной методикой определения# Отсутствие <i>Salmonella</i> (10 г или 10 мл) Отсутствие <i>Escherichia coli</i> (1 г или 1 мл) Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> (1 г или 1 мл)

Таблица 5.1.4.-2

Критерии приемлемости для микробиологической чистоты нестерильных субстанций для фармацевтического использования

	Общее количество аэробов (ОКА), КОЕ/г или КОЕ/мл	Общее количество грибов (ОКГ), КОЕ/г или КОЕ/мл
Субстанции для фармацевтического использования	10 ³	10 ²

В случае указания критерия приемлемости для микробиологической чистоты он интерпретируется следующим образом:

- 10¹ КОЕ: максимально допустимое число = 20;
- 10² КОЕ: максимально допустимое число = 200;
- 10³ КОЕ: максимально допустимое число = 2000 и так далее.

В таблице 5.1.4.-1 присутствует перечень специфицированных микроорганизмов, для которых установлены критерии приемлемости. Данный список не является обязательно исчерпывающим, и для некоторых лекарственных средств может быть необходимым включение испытания на другие микроорганизмы в зависимости от природы исходного материала и процесса производства.

Если показано, что ни одно из описанных испытаний не даст достоверное значение содержания микроорганизмов на необходимом уровне, используют валидированный метод с пределом обнаружения, как можно более близким к заявленному критерию приемлемости.

Значимость других обнаруженных микроорганизмов, кроме перечисленных в таблице 5.1.4.-1, оценивается следующими условиями:

- применение продукта: опасность варьирует в зависимости от пути введения (глаза, нос, дыхательный тракт);
- природа продукта: его способность поддерживать рост, наличие подходящего антимикробного консерванта;
- способ применения;
- предполагаемый реципиент: риск может отличаться для новорожденных, детей и ослабленных людей;
- использование иммунодепрессантных средств, кортикостероидов;
- наличие заболевания, раны, повреждение органов.

Где это обосновано, специально подготовленным в области микробиологии и интерпретации микробиологических данных персоналом проводится оценка рисков релевантных факторов. В случае сырья, при оценке учитывают процессы, которым подвергается продукт, действующая технология испытаний и доступность материалов требуемого качества.

[#]Наличие и количественное содержание специфицированных микроорганизмов в субстанциях для фармацевтического использования, если нет других указаний в частных статьях, определяется в следующих случаях.

1. *Субстанции для фармацевтического использования для производства стерильных лекарственных средств, а также лекарственных средств для местного и ингаляционного применения и трансдермальных пластырей (для указанных субстанций критерий приемлемости по содержанию общего количества жизнеспособных аэробов – ОКА и ОКГ суммарно – не более 10² КОЕ/г или КОЕ/мл):*

- отсутствие грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи (1 г или 1 мл), либо отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (1 г или 1 мл) при испытании в соответствии с альтернативной методикой определения;
- отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* (1 г или 1 мл);
- отсутствие *Staphylococcus aureus* (1 г или 1 мл).

2. *Фармацевтические субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных средств и вспомогательные вещества:*

- отсутствие *Escherichia coli* (1 г или 1 мл).

3. *Субстанции для фармацевтического использования для производства лекарственных средств, в которых лимитируется содержание *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* и бактерий семейства *Enterobacteriaceae*:*

- отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* (1 г или 1 мл);
- отсутствие *Staphylococcus aureus* (1 г или 1 мл);
- отсутствие *Salmonella* (10 г или 10 мл);
- не более 10² КОЕ грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи (1 г или 1 мл), либо не более 10² КОЕ бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (1 г или 1 мл) при испытании в соответствии с альтернативной методикой определения.

4. *Субстанции для фармацевтического использования природного происхождения (растительного, животного или минерального), для которых предварительная антимикробная обработка невозможна и в отношении которых компетентный уполномоченный орган допускает микробное загрязнение исходного материала более 10³ жизнеспособных микроорганизмов в 1 г или в 1 мл (не более 10⁴ КОЕ/г или КОЕ/мл):*

- отсутствие *Escherichia coli* (1 г или 1 мл);
- отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* (1 г или 1 мл);
- отсутствие *Staphylococcus aureus* (1 г или 1 мл);
- отсутствие *Salmonella* (10 г или 10 мл);
- не более 10² КОЕ грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи (1 г или 1 мл), либо не более 10² КОЕ бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (1 г или 1 мл) при испытании в соответствии с альтернативной методикой определения.[#]

Рекомендуемые критерии приемлемости для микробиологической чистоты лекарственных средств растительного происхождения для внутреннего применения приведены в общей статье 5.1.8.

5.1.5. ПРИМЕНЕНИЕ F_0 КОНЦЕПЦИИ ПРИ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПАРОМ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Настоящая статья носит информационный характер.

Значение F_0 процесса стерилизации насыщенным паром – это поражающее действие, выраженное в терминах, эквивалентных времени в минутах, при температуре 121 °С, оказываемое процессом на лекарственное средство в его конечном контейнере по отношению к микроорганизмам, имеющим теоретическую величину Z , равную 10.

Общее значение F_0 процесса, включающего стадию нагревания и остывания, может быть рассчитано объединением летальных норм относительно времени в дискретных температурных интервалах.

Если процесс паровой стерилизации выбран на основе F_0 концепции, должно быть уделено большое внимание тому, чтобы постепенно была достигнута полная стерилизация. В дополнение к валидации процесса необходимо проведение непрерывного строгого микробиологического контроля в ходе всего процесса, чтобы доказать, что микробиологические параметры находятся в допустимых пределах не более $SAL 10^{-6}$.

По отношению к паровой стерилизации величина Z – это величина, связывающая термостойкость микроорганизмов и изменение температуры. Величина Z – это изменение температуры, необходимое для изменения величины D на 10.

Величина D (или величина десятичного уменьшения) – параметр стерилизации (продолжительность или поглощенная доза), обеспечивающий снижение числа жизнеспособных микроорганизмов до 10 % от исходного числа. Это величина, определяемая только при точных экспериментальных условиях.

Для расчетов применяются следующие математические выражения:

$$F_0 = D_{121} \cdot (\lg N_0 - \lg N) = D_{121} \lg IF,$$

где:

D_{121} – величина D стандартных спор (5.1.2) при температуре 121 °С;

N_0 – начальное число жизнеспособных микроорганизмов;

N – конечное число жизнеспособных микроорганизмов;

IF – коэффициент инактивации.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\lg D_1 - \lg D_2},$$

где:

D_1 – величина D микроорганизмов при температуре T_1 .

D_2 – величина D микроорганизмов при температуре T_2 .

$$IF = \frac{N_0}{N} = 10^{t/D},$$

где:

t – время экспозиции;

D – величина D микроорганизмов в условиях экспозиции.

01/2013:50106

5.1.6. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ

МЕТОДЫ

КОНТРОЛЯ

Настоящая статья приводится для информации

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Цель данного раздела – способствовать внедрению и использованию альтернативных микробиологических методов, когда это может привести к экономически эффективному микробиологическому контролю и повысить обеспечение качества лекарственных средств. Данные альтернативные методы также могут применяться в мониторинге окружающей среды.

Микробиологические методы, описанные в Фармакопее, используются на протяжении века и такие методы, как определение общего количества и идентификация микроорганизмов, используются микробиологами до сих пор. На протяжении десятилетий эти методы являются незаменимыми при обеспечении контроля и микробиологической безопасности производства лекарственных средств. Однако общепринятые микробиологические методы времязатратны, и результаты доступны только после инкубационного периода, который обычно составляет до 14 дней. Поэтому результаты стандартных микробиологических методов редко дают возможность провести профилактические и корректирующие действия.

Альтернативные методы контроля микробиологической чистоты были введены недавно, и некоторые из этих методов продемонстрировали возможность получения результатов в реальном или почти реальном времени с возможностью проведения корректирующего действия. Эти новые методы могут также привести к значительному улучшению качества испытания.

В данной справочной статье описаны новые микробиологические методы для фармацевтического применения. Для каждого метода сначала описан основной принцип, и затем обсуждаются его преимущества и недостатки. Потенциальное применение характеризует области применения, в которых может использоваться описываемый метод с учетом его принципов действия: целью предоставления информации не является предложение использования на практике данного метода. Также описаны общие положения о валидации методов. Проиллюстрированы специфические примеры для каждого типа метода. Подробный валидационный протокол представлен в конце этого раздела.

Данная статья не предназначена ни для рекомендации одного метода вместо другого, ни для представления эксклюзивного или исчерпывающего списка альтернативных методов, которые могут быть использованы для фармацевтического микробиологического контроля. Однако данная справочная статья может быть использована в процессе выбора альтернативного микробиологического метода как дополнения или альтернативы общепринятым микробиологическим подходам, а также для предоставления методологических принципов процесса валидации выбранного метода. Очевидно, что в этой быстро развивающейся области появятся и новые методы. Методологические принципы, представленные в данной статье, могут в равной степени быть применимы и для них.

Существует 3 основных вида определений, характерных для микробиологических испытаний. Они включают:

- качественные испытания на присутствие или отсутствие микроорганизмов;
- количественные испытания по определению общего числа микроорганизмов;
- испытания на подлинность.

1-1. КАЧЕСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ НА ПРИСУТСТВИЕ ИЛИ ОТСУТСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

В стандартном микробиологическом анализе такой вид испытания характеризуется использованием изменения прозрачности или других зависимых от роста изменений в питательной среде для подтверждения присутствия жизнеспособных микроорганизмов в испытуемом образце. Самый распространенный пример этого испытания – это испытание на стерильность. Другим примером такого вида определения являются испытания, предназначенные для оценки присутствия или отсутствия определенного вида жизнеспособных микроорганизмов в образце.

1-2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОБЩЕГО ЧИСЛА МИКРООРГАНИЗМОВ

Мембранная фильтрация и чашечный метод подсчета являются общепринятыми методами для подсчета числа жизнеспособных микроорганизмов, представленных в образце. Метод наиболее вероятного числа (НВЧ) – это еще один пример этих методов. НВЧ был разработан как способ подсчета числа жизнеспособных микроорганизмов, представленных в образце, не подлежащих прямому посеву на чашки.

1-3. ИСПЫТАНИЯ НА ПОДЛИННОСТЬ

Биохимическая и морфологическая характеристики неизвестного микроорганизма – это классический метод идентификации, используемый в фармакопейных испытаниях. Недавно разработанные методы ускорили и автоматизировали подходы к идентификации, особенно в области обработки результатов, анализа и хранения. Некоторые новые подходы, которые были введены в эти методы, включают биохимические реакции, поглощение углеродного субстрата, характеристику состава жирных кислот, определение характерной последовательности полос после рестрикции эндонуклеазой и использование секвенирования 16S рДНК.

2. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕТОДОВ

Альтернативные микробиологические методы используют прямые и непрямые методы детектирования; в некоторых случаях усиление сигнала достигается методами обогащения. С учетом этих различий и для удобства их рассмотрения в рамках этого раздела альтернативные методы контроля микробиологической чистоты разделены на 3 категории:

- методы, основанные на росте микроорганизмов, в которых различимый сигнал обычно достигается по истечении определенного периода роста;

- прямые измерения, в которых индивидуальные клетки дифференцированы и отчетливо видны;

- анализ клеточных компонентов, при котором экспрессия специфических компонентов клеток используется для не прямой оценки присутствия микроорганизмов.

В некоторых случаях эти различия искусственные, но они дают возможность создать рабочую классификацию.

2-1. МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА РОСТЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

2-1-1. Раннее выявление роста

2-1-1-1. Общие критические аспекты методов, основанных на раннем выявлении роста

Такие методы в значительной степени зависят от роста микроорганизмов для получения обнаруживаемого количества микроорганизмов. Для наблюдаемого в лекарственных средствах типично низкого уровня микробной контаминации выявление может занимать 24 ч или более, особенно в случаях дрожжевых и плесневых грибов. Повышенная чувствительность может быть достигнута с помощью фильтрации образцов. В этом случае после фильтрации мембрану инкубируют в питательной среде, а результат выражают как присутствие или отсутствие в количестве, соответствующем отфильтрованному объему. Из-за использования стадии инкубирования в жидкой среде данные испытания не могут использоваться для количественного определения, а только для оценки отсутствия/присутствия в анализируемом количестве. Анализ более одного образца можно проводить полуколичественной оценкой (испытание на предельное содержание). Основным преимуществом таких методов зачастую является возможность одновременного анализа большого количества образцов и получение результатов за минимальные сроки.

2-1-1-2. Электрохимические методы Принципы измерения.

Микроорганизмы, которые размножаются и метаболизируют в подходящей питательной среде, продуцируют сильно заряженные ионные метаболиты из слабо заряженных органических питательных веществ, что приводит к изменению электрических свойств в этой среде. Эти изменения сопротивления (измеряемые с помощью электропроводности или емкости) измеряются электродами, погруженными в сосуды с питательной средой и соприкасающимися с ней. Измеряемая конечная точка – это время, затраченное на определение заранее заданного изменения сопротивления; время определения обратно пропорционально исходному

размеру первичного инокулята. Для дрожжевых и плесневых грибов, которые вызывают лишь незначительные изменения электрического сопротивления, обычно применяют непрямое измерение электропроводности, используя резервуар с калия гидроклоридом. Допускается также и прямое измерение емкости.

Критические аспекты. Автоматизированное детектирование с преобразованием в электронные данные, картирование изменения сопротивления, соответствующего кривой роста микроорганизмов, и снижение продолжительности времени действия до 48 ч.

Потенциальная область применения. Микробиологический анализ антибиотиков, эффективность антимикробных консервантов и определение присутствия/отсутствия микроорганизмов в количестве испытуемого образца при проведении оценки общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов.

2-1-1-3. Измерение потребляемого или продуцируемого газа

Принцип измерения. Активно размножаясь и метаболизируя, организмы используют соответствующую питательную среду, что приводит к образованию метаболитов или удалению специфических питательных веществ. В этом случае могут контролироваться изменения в газовом составе свободного пространства над продуктом в закрытых сосудах с культурой с помощью датчиков давления, реагирующих на продуцирование газа (например, CO₂) или поглощение газа (например, O₂). Могут использоваться и другие индикаторы, включая калориметрическое детектирование CO₂.

Критические аспекты. Для медленно растущих микроорганизмов, таких как микобактерии, метод предполагает более быстрое детектирование. Между исходной микробной нагрузкой и определяемой конечной точкой отсутствует прямая зависимость. Температура инкубации и алгоритм обработки данных значительно влияют на результаты.

Потенциальная область применения. Продукты, в которых могут присутствовать медленно растущие микроорганизмы.

2-1-1-4. Билюминесценция

Принципы измерения. Аденозинтрифосфат (АТФ) является хорошо изученным маркером жизнеспособности клеток. В данном методе АТФ должен, прежде всего, извлекаться из микроорганизмов с помощью подходящего экстрагента с последующим количественным определением с использованием люциферин/люциферазной ферментной системы, которая излучает свет пропорционально присутствующему в пробе АТФ. Излучаемый свет измеряется билюминометром и выражается в относительных световых единицах (ОСЕ) билюминесценции в жидкой среде. Значения ОСЕ, полученные при анализе испытуемого образца, сравнивают с пороговой величиной среды, определенной как 2- или 3-кратное значение ОСЕ среды для культивирования или суспензии образца. Результат исследования положительный, если ОСЕ, полученные от испытуемого образца, превышают пороговую величину. При изменении метода микроорганизмы, задержанные на мембране, инкубируют на агаровой среде с последующим определением микроорганизмов камерой прибора с зарядовой связью (ПЗС). Результаты исследования выражают в микроКОЕ. Данный метод является количественным, но имеет узкий диапазон линейности.

Критические аспекты. Если испытуемое средство имеет высокий уровень микробной контаминации (приблизительно 500–1000 КОЕ на пробу испытуемого образца), то определение является быстрым (1 ч). При низком уровне контаминации (менее 100 КОЕ на пробу испытуемого образца) необходимо увеличение числа микроорганизмов с помощью стадии инкубации в питательной среде (жидкий или твердый агар) в течение 12–48 ч в соответствии с используемым методом. После инкубации в жидких средах одна единичная клетка, способная к росту, увеличивается от 1 до 1000 и может быть определена. Выход АТФ варьируется от одного микроорганизма к другому, причем бактерии, содержащие 1–10 фг/клетка, и грибы, содержащие 100 фг/клетка, а также многие другие факторы, включая вид, фазу роста клетки, тип питания, клеточный стресс или возраст клетки, могут повлиять на содержание АТФ в клетке. Поэтому определить число микроорганизмов непосредственно по значению ОСЕ невозможно. Кроме того, мутность и цвет образца могут оказать влияние на реакцию путем или усиления реакции, или увеличения уровня испускаемого света, или привести к понижению уровня испускаемого света. Так как реакция является ферментативной, продукты, которые ингибируют или уменьшают активность ферментов, могут также повлиять на результаты испытания. На практике такое

влияние встречается редко, но должно быть тщательно изучено при валидации процесса. Реакция также чувствительна к присутствию нуклеотидфосфатов, таких как АДФ и ГТФ, которые влияют на результаты вследствие образования АТФ в присутствии аденилаткиназы. Этот фермент используют для повышения чувствительности некоторых биOLUMИНИСЦЕНТНЫХ методов: добавляют третий реактив, содержащий АДФ, и продуцируется новый АТФ в присутствии аденилаткиназы, высвобождаемой из микроорганизмов.

Потенциальная область применения. Определение эффективности антимикробных консервантов, оценка присутствия/отсутствия микроорганизмов в определенном количестве испытуемого образца при определении общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов (биOLUMИНИСЦЕНЦИЯ в пробирке или микропланшете), подсчет общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов (биOLUMИНИСЦЕНЦИЯ на мембране), мониторинг окружающей среды и воды. Метод находит применение для оценки фильтруемых и нефилтруемых веществ.

2-1-1-5. Микрокалориметрия

Принципы измерения. Обмен веществ микроорганизмов происходит с выделением тепла, которое может быть точно измерено микрокалориметром. Теплопродукция может быть измерена путем помещения контаминированного испытуемого образца в запаянную ампулу, содержащую среду для роста, а затем в калориметр. При использовании чувствительного оборудования могут быть построены кривые микробного роста. Большая бионагрузка может быть определена проточной калориметрией.

Критические аспекты. Теоретически для данного метода требуется не микробный рост, а только катаболическая активность. Тем не менее необходимо минимальное количество микроорганизмов для того, чтобы значения теплоотдачи были выше базовой линии, и обычно этого можно достигнуть посредством использования методов обогащения.

Потенциальная область применения. Метод для определения эффективности антимикробных консервантов.

2-1-1-6. Турбидиметрия

Принципы измерения. Рост микроорганизмов вызывает видимое помутнение среды. Это изменение среды может быть количественно точно определено путем измерения оптической плотности при заданной длине волны. В этой простейшей форме такие измерения проводятся на стандартном спектрофотометре в диапазоне длин волн обычно от 420 нм до 615 нм. Используются альтернативные автоматизированные системы с применением микропланшетов, позволяющие проводить постоянное считывание данных с ранним детектированием изменения оптической плотности.

Критические аспекты. Были предприняты попытки экстраполировать значения исходной бионагрузки от длительности периода, необходимого для детектирования, однако данные зависимости могут быть достоверны только для интактных микроорганизмов с воспроизводимыми характеристиками роста. Эти методы не способны различать жизнеспособные и нежизнеспособные микроорганизмы.

Потенциальная область применения. Определение размера инокулята в микробной суспензии с помощью градуировочных кривых для использования в фармакопейном анализе. Определение в автоматическом режиме чувствительности к консервантам испытуемых микроорганизмов, извлеченных из готовых лекарственных средств.

2-1-1-7. Методы, основанные на бактериофагах

Принципы измерения. Бактериальные вирусы (бактериофаг, фаг) могут приводить к инфицированию клеток-хозяев, вызывая либо лизис, либо встраивание их генетического материала и выработку новых белков. Их высокая специфичность к клетке-хозяину может использоваться в методах детектирования, которые используют последствия заражения как конечную точку. Такие конечные точки включают: формирование бляшки на твердом газоне испытуемых бактерий; определение внутриклеточного содержимого, высвобожденного из лизированных бактерий (возможно колориметрическим методом); эффекты, вызываемые бактериофагами, такие как образование льда или биOLUMИНИСЦЕНЦИЯ, возникающая при заражении генетически модифицированным бактериофагом. Колифаги с флуоресцентной меткой могут быть использованы для

селективного определения жизнеспособных *E. coli* в комбинации с ПЭФМ (см. раздел 2-2-3).

Критические аспекты. Детектирование, основанное на использовании бактериофагов, может применяться как для одиночных, так и для смешанных культур, в которых специфичность хозяина допускает и детектирование, и идентификацию. Для определения конечных точек обычно требуется минимальное количество клеток-мишеней для получения измеряемого сигнала, что приводит к необходимости обогащения в случаях с низкой бионагрузкой. Состав испытуемого образца может неблагоприятно влиять на процесс вирусного заражения. В большинстве случаев существует узкий круг клеток-хозяев, что делает затруднительным определение широкого спектра микроорганизмов, которые присутствуют в образце.

Потенциальная область применения. В основном эти методы используются в исследовательских целях при промышленных разработках, связанных преимущественно с клинической и пищевой микробиологией. Данные методы, вероятно, будут использоваться для определения присутствия/отсутствия указанных микроорганизмов.

2-1-2. Разработка питательных сред для улучшения обнаружения

Принципы измерения. Питательные среды существуют на протяжении многих лет и постоянно совершенствуются. Современный этап развития характеризуется появлением хромогенных субстратов, которые все больше и больше используются в клинической и пищевой микробиологии. Возможность обнаруживать присутствие определенных ферментов, используя подходящие субстраты, привела к разработке большого количества методик идентификации микроорганизмов вручную или с использованием автоматизированных приборов. Включение таких субстратов в селективную или неселективную первичную среду для выделения микроорганизмов исключает необходимость последующего пассажа и биохимических тестов для идентификации определенных микроорганизмов. В результате хромогенные жидкие или твердые питательные среды обеспечивают условия для специфической ферментативной активности, по которой проводится обнаружение и дифференциация микроорганизмов. В состав этих специфических сред включают определенные субстраты, которые в процессе роста гидролизуются специфическими клеточными ферментами бактерии или гриба. Выбор субстрата обоснован искомой диагностической ферментативной активностью и окрашенными индикаторами.

Критические аспекты. Использование инновационных питательных сред имеет несколько преимуществ: улучшенное распознавание колоний в смешанной культуре, простота использования и легкость оценки результатов. В дополнение, время ответа сокращается, поскольку рост и идентификация микроорганизмов осуществляются одновременно. Однако должна быть проведена тщательная валидация среды, подтверждающая специфичность, селективность и робастность методики. Качество сигнала основывается не только на тщательном подборе ферментов, которые используются в качестве принципа детектирования, так как эти ферменты могут присутствовать в различных видах, но и на физико-химических характеристиках среды, таких как pH.

Потенциальная область применения. Обнаружение определенных микроорганизмов, таких как *E. coli*, бактерии группы кишечной палочки, *Salmonella*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* spp.; особые преимущества могут быть получены при использовании для испытания на присутствие/отсутствие. Дрожжевые грибы могут быть также обнаружены с использованием хромогенной питательной среды.

2-2. ПРЯМОЕ ИЗМЕРЕНИЕ

2-2-1. Твердофазная цитометрия

Принципы измерения. Для выделения микроорганизмов используют мембранный фильтр. Микроорганизмы окрашиваются путем маркирования флуорофором в качестве индикатора жизнеспособности или до, или после фильтрования. Изначально флуорофор представляет собой нефлуорогенный конъюгированный субстрат, который под влиянием внутриклеточных ферментов расщепляется с выделением флуоресцентного вещества. Интактная клеточная мембрана необходима для удержания флуорофора внутри цитоплазмы микроорганизма. Возбуждающее излучение лазера и автоматизированное

сканирование позволяют обнаруживать единичные жизнеспособные флуоресцентные микроорганизмы. Соответствующее программное обеспечение позволяет отличать жизнеспособные микроорганизмы от автофлуоресцентных частиц. Высокая чувствительность и быстрота детектирования делает возможным обнаружение микроорганизмов, присутствующих в образце, почти в реальном времени. Общее число клеток можно определять с использованием постоянно флуоресцирующего красителя.

Критические аспекты. С помощью данного метода можно обнаружить метаболически активные, жизнеспособные и сложно культивируемые или не поддающиеся культивированию микроорганизмы. Это может привести к переоценке микробиологических норм, установленных для испытуемого образца. Для обнаружения спор необходима реактивация их роста. Может достигаться обнаружение одной клетки определенного вида, однако на настоящий момент идентификация не входит в стандартный протокол микробиологического испытания. Для избирательного обнаружения могут быть использованы флуоресцентные антитела. Автофлуоресцентные частицы, которые сложно отличить от микроорганизмов, могут привести к получению ложноположительных результатов.

Потенциальная область применения. Быстрый и чувствительный метод для неспецифической оценки бионагрузки. Используется при контроле воды фармацевтической категории.

2-2-2. Проточная цитометрия

Принципы измерения. Микроорганизмы, помеченные флуорофором, могут обнаруживаться в суспензии при прохождении через проточную кювету цитометра. Применение флуорофорного субстрата позволяет дифференцировать жизнеспособные микроорганизмы от нежизнеспособных частиц (смотри 2-2-1).

Критические аспекты. Проточная цитометрия может применяться в микробиологическом анализе как фильтруемых, так и нефилтруемых материалов. Проточный цитометрический анализ обеспечивает детектирование почти в реальном масштабе времени, но он не так чувствителен, как твердофазная цитометрия. Для повышения чувствительности при использовании в фармацевтических целях, часто бывает необходимо включить дополнительно стадию инкубации в питательной среде. В этом случае метод переходит в категорию методов, основанных на росте. Для оптимизации условий анализа нефилтруемых образцов может потребоваться приготовление серийных разведений образца, при этом размер механических включений может значительно повлиять на данный процесс. За исключением возможности использования для образца мембранной фильтрации, аналогичные проблемы могут возникнуть и при твердофазной цитометрии. Проблемой также может быть агглютинация бактерий (например, *S. aureus*).

Потенциальная область применения. В отличие от твердофазной цитометрии, данный метод может применяться для определения и подсчета общего количества микроорганизмов в материалах, содержащих значительное количество механических включений. Если необходима пре-инкубационная стадия, метод становится качественным испытанием.

2-2-3. Метод прямой эпифлуоресцентной фильтрации (ПЭФМ, DEFT)

Принципы измерения. Данная методика может рассматриваться как предшественник твердофазной цитометрии. Микроорганизмы, сконцентрированные путем фильтрации из образца, ранее окрашивались флуоресцентным красителем – акридиновым оранжевым. В настоящее время более широко используется 4',6-диамидино-2-фенилиндола (ДАФИ, *DAPI*), который может определяться путем эпифлуоресцентного освещения. Методики флуоресцентной окраски жизнеспособных клеток, применяемые в твердофазной цитометрии (смотри 2-2-1), могут дополнять окраску ПЭФМ, а флуоресцентные окислительно-восстановительные красители, такие как 5-циано-2,3-дитолилтетразолия хлорид (*CTC*, *5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride*), могут использоваться для обнаружения дышащих клеток. В сочетании с микроскопией этот метод позволяет быстро обнаруживать микроорганизмы, его абсолютная чувствительность зависит от объема фильтруемого вещества и числа исследуемых полей зрения. В сочетании с анализом изображения, полуавтоматические системы автофокусирования способствовали

расширению использования данного метода. Существует модификация метода, при которой отбор образцов осуществляется с использованием клейкого материала, что позволяет собирать клетки с поверхности с последующим их окрашиванием и визуальным наблюдением через эпифлуоресцентный микроскоп.

Критические аспекты. Распределение микроорганизмов на мембране влияет на робастность метода. На интенсивность флуоресценции могут повлиять процесс окрашивания и метаболический статус микроорганизмов. Кратковременный период нахождения культуры на поверхности фильтра до окрашивания способствует формированию микроколоний, которые легко окрашиваются, могут быть легко подсчитаны и являются доказательством жизнеспособности. Современные разработки с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации (*FISH, fluorescence in situ hybridisation*), являющейся результатом дополнительного воздействия олигонуклеотидной пробы, маркированной флуоресцентной меткой, со специфической последовательностью рРНК, позволяют проводить селективное детектирование.

Потенциальная область применения. Возможности ПЭФМ обычно ограничены жидкостями с низкой вязкостью, несмотря на то, что предварительное разведение или предварительная фильтрация периодически используются для вязких или дисперсных веществ. Метод эффективно используется для контроля общего количества микроорганизмов в водных лекарственных средствах.

2-3. АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ

2-3-1. Фенотипический

2-3-1-1. Иммунологические методы

Принципы измерения. Реакции антителоантиген могут использоваться для детектирования уникальных клеточных характеристик определенных микроорганизмов. Эти реакции могут быть связаны с реакцией агглютинации, колориметрическими или флуориметрическими конечными точками, позволяющими проводить как качественное, так и количественное определение. Твердофазный иммуноферментный анализ (*ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay*) является основой для многих простых твердофазных методик.

Критические аспекты. Иммунологические методы детектирования зависят от уникальной экспрессии специфических идентификаторов, но необязательно подтверждают присутствие жизнеспособных микроорганизмов.

Потенциальная область применения. Обнаружение и идентификация определенных микроорганизмов.

2-3-1-2. Профили жирных кислот

Принципы измерения. Состав жирных кислот микроорганизмов стабилен, четко зафиксирован и характеризуется высокой степенью гомогенности в рамках различных таксонометрических групп. Штамм выращивают на стандартной питательной среде и собирают. Жирные кислоты омыляют, метилируют и экстрагируют. Наличие и количество полученных метиловых эфиров жирных кислот измеряют с помощью газовой хроматографией высокого разрешения. Состав жирных кислот испытуемого штамма сравнивается с базой данных известных штаммов для возможного совпадения и идентификации.

Критические аспекты. Использование профилей жирных кислот для микробиологической идентификации требует высокой степени стандартизации. Для определения состава жирных кислот микробных клеток крайне важно обеспечить культивирование штаммов с использованием стандартных питательных сред и стандартных условий инкубации. Для газовой хроматографии должны применяться стандартные условия, среди которых большое значение имеют многократные определения калибровочных стандартов и известных штаммов.

Потенциальная область применения. Идентификация или характеризирование микрофлоры продукта и окружающей среды для контроля контаминации и обнаружения определенных микроорганизмов.

2-3-1-3. Инфракрасная спектроскопия на основе Фурье-преобразования (*ИК-ФП, FTIR, Fourier transform infrared*)

Принципы измерения. Фурье-преобразование ИК-спектра интактных микроорганизмов дает стабильный, опознаваемый образ (паттерн), типичный для таксонометрических групп микроорганизмов. Анализ ИК-ФП-спектра может выполняться на приборах, имеющих в продаже. Штамм выращивают на стандартной питательной среде и собирают. Клеточную массу переносят на носитель и снимают ИК-спектр. После Фурье-преобразования полученный спектр сравнивают с базой данных известных штаммов для определения совпадения и идентификации.

Критические аспекты. Использование образцов ИК-ФП-спектров для микробиологической идентификации требует высокой степени стандартизации. Для использования ИК-ФП-спектров образцов микробиологических клеток крайне важно обеспечить культивирование штаммов с использованием стандартных питательных сред и стандартных условий инкубации. При анализе клетки должны быть в одинаковом состоянии ростового цикла. Особое внимание необходимо уделить работам по валидации.

Потенциальная область применения. Идентификация или характеризирование микрофлоры продукта и окружающей среды для контроля контаминации и обнаружения определенных микроорганизмов.

2-3-1-4. Масс-спектрометрия

Принципы измерения. Газообразные продукты гидролиза, выделяемые при нагревании выделенных микроорганизмов под вакуумом, могут быть проанализированы с использованием масс-спектрометрии с получением характеристических спектров. Аналогично интактные микробные клетки, подвергнутые масс-спектрометрическому анализу с ионизацией лазерной десорбцией при содействии матрицы и детектированием с использованием времяпролетного детектора (*MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*), дают характерные профили заряженных частиц. Такие спектры могут сравниваться с известными профилями в качестве быстрого средства идентификации.

Критические аспекты. Перед анализом требуется культивирование штаммов.

Потенциальная область применения. Идентификация или характеризирование микрофлоры продукта и окружающей среды для контроля контаминации и обнаружения определенных микроорганизмов.

2-3-1-5. Биохимический количественный анализ, основанный на физиологических реакциях

Принципы измерения. Биохимическому количественному анализу обычно предшествует окрашивание по Грамму или другое дифференцирующее испытание для определения соответствующего протокола испытания. Испытуемые суспензии микробных клеток оценивают с использованием биохимических наборов реагентов. Известно, что микроорганизмы обладают специфическими реакциями на эти биохимические вещества, например, использование специфических источников углерода. Идентификация культуры проводится путем сравнения профиля биохимической реакции с базой данных. Эти методы могут выполняться вручную или с использованием автоматических измерительных приборов.

Критические аспекты. Необходима чистая колония, возраст которой не должен превышать 3 дней. Выполнение испытания не представляет сложности, однако интерпретация результатов может оказаться субъективной. В зависимости от используемой системы и исследуемых микроорганизмов, результаты могут быть получены быстро.

Потенциальная область применения. Идентификация или характеризирование микрофлоры продукта и окружающей среды для контроля контаминации и обнаружения определенных микроорганизмов.

2-3-2. Генотипический

2-3-2-1. Методики, основанные на амплификации нуклеиновых кислот (МАНК, NAAT, nucleic acid amplification techniques)

Общие принципы измерения. МАНК основывается на многочисленном повторении процесса полимеризации ДНК, приводящем к экспоненциальному увеличению специфического фрагмента нуклеиновой кислоты, т.е. использованию полимеразной цепной реакции (ПЦР, *PCR, polymerase chain reaction*). В этом термофильном циклическом процессе специфический фрагмент ДНК реплицируется с использованием олигонуклеотидных праймеров (см. статью 2.6.21). РНК также можно реплицировать с

помощью ПЦР после транскрибирования в кДНК с использованием обратной транскриптазы. Эта методика известна как ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, *RT-PCR, reverse transcriptase PCR*). Альтернативно, для увеличения многократных антисмысловых копий целевых РНК доступны особые методики, основанные на амплификации РНК, например, амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (*NASBA, nucleic acid sequence-based amplification*) или транскрипционно-опосредованная амплификация (*TMA, transcription-mediated amplification*). Фрагменты амплифицированных нуклеиновых кислот могут анализироваться несколькими методами: анализ размера фрагмента, анализ запрограммированной последовательности, реамплификация со второй парой праймеров или специфическое детектирование гибридизацией с флуоресцентно-меченной пробой. В зависимости от выбранного анализа амплификационная методика может быть качественной, полуколичественной или количественной. С целью идентификации/характеризации может быть применен анализ последовательности специфических частей генома (т.е., 16S или 23S рРНК).

Общие особенности. У МАНК есть много преимуществ перед классическими методами обнаружения микроорганизмов:

- методы являются высокоспецифичными при обеспечении специфичности выбранных праймеров для определенных микроорганизмов или групп микроорганизмов;
- данные методы являются быстрыми, позволяют преодолеть проблему длительного инкубационного периода;
- данные методы являются высокочувствительными, позволяют оптимально определить и амплифицировать один единичный фрагмент нуклеиновой кислоты в реакционной смеси.

Однако существуют многочисленные практические ограничения по их использованию:

- чувствительность методов в значительной степени зависит от степени концентрации клеток-мишеней в образце;
- присутствие ингибиторов ферментативного процесса приводит к ложноотрицательным результатам;
- начальный объем испытуемого образца незначительный;
- существует высокая вероятность перекрестной контаминации предыдущими амплифицированными фрагментами, что приводит к получению ложноположительных результатов.

В зависимости от цели исследования, должен быть сделан выбор РНК или ДНК мишени для амплификации. Выбор мишени влияет на корреляцию с жизнеспособностью. Использование ДНК в качестве маркера имеет недостаток, поскольку мертвые микроорганизмы также содержат ДНК, в то время как и РНК быстро разрушается в мертвых бактериях и поэтому она считается лучшим маркером жизнеспособности.

Критические аспекты ОТ-ПЦР. ПЦР с обратной транскрипцией характеризуется синтезом кДНК с использованием РНК а качестве матрицы. На этой стадии используется обратная транскриптаза. Затем специфическая часть кДНК амплифицируется с помощью ПЦР. В зависимости от качества выделенной РНК эффективность синтеза кДНК может варьировать. ОТ-ПЦР может использоваться специально для детектирования РНК, если содержание ДНК в РНК-образце минимально.

Критические аспекты методик амплификации РНК. Было установлено, что данные методы являются высокоэффективными для специфического (количественного) определения РНК. Однако их достаточно сложно применять в повседневной практике.

Критические аспекты количественного (полуколичественного) определения (ПЦР в реальном времени). Классические методики ПЦР основаны на детектировании конечной точки. В большинстве случаев анализ фрагментов проводится с использованием агарозного геля и особых маркеров размера. Однако отсутствует корреляция между количеством продукта ПЦР в конце реакции и исходным количеством молекулы-мишени. Напротив, количество определяемого ПЦР продукта в начале экспоненциальной фазы реакции очень хорошо коррелирует с исходным количеством нуклеиновой кислоты. Современные ПЦР методики в реальном времени разрабатываются для измерения этой экспоненциальной

фазы реакции. В этих методиках получают данные амплификации, по которым можно установить исходное количество молекул-мишеней. Специфические меченые пробы обеспечивают регистрацию образующегося продукта ПЦР в реальном времени, позволяя увидеть наглядно экспоненциальную фазу ПЦР реакции. Количественный анализ молекулы-мишени может быть проведен путем сравнения графиков амплификации серий стандартных разведений. На рынке доступны автоматические системы ПЦР в реальном времени. Дополнительным преимуществом таких систем является существенно низкий риск перекрестной контаминации, поскольку ПЦР продукты сканируются лазером в закрытых пробирках. Однако существует большая сложность по созданию стандартов.

Критические аспекты амплификации генов, кодирующих 16S или 23S рРНК. ПЦР в основном применяется для амплификации и последующего анализа последовательности специфических частей генов, кодирующих 16S или 23S рРНК. Анализ этих специфических ДНК-последовательностей в большинстве случаев позволяет идентифицировать микроорганизмы на видовом уровне. Выбор соответствующих универсальных праймеров или даже видоспецифических пар праймеров из международных баз данных обеспечивает высокую специфичность амплификации фрагмента. Современная систематическая классификация основана на сравнительном анализе последовательностей.

Потенциальная область применения. Вследствие высокой специфичности методик амплификации, они наиболее пригодны для целей идентификации. МАНК пригодна для детектирования определенных микроорганизмов или конкретных групп, таких как микоплазмы. Для количественного определения микроорганизмов требуется количественная ПЦР в реальном времени.

2-3-2-2. Генетические «отпечатки пальцев»

Принципы измерения. Данный метод определяет характеристики и идентифицирует микроорганизмы с помощью фрагментов рестрикции нуклеиновых кислот геномов бактерий и грибов. ДНК экстрагируют из чистого лизата микробных клеток и разрезают на фрагменты с помощью рестриктаз. ДНК-фрагменты разделяют по размерам с помощью электрофореза, проявляют и сравнивают результат с другими известными профилями изолированных микроорганизмов. Генетический «отпечаток» является стабильным маркером, который делает возможным оптимальное распознавание видов или даже определение характеристик ниже видового уровня. Типичным примером такого метода является риботипирование. Существуют также методики генетической экспертизы, основанные на ПЦР с использованием праймеров, которые связываются с несколькими участками в микробном геноме, создавая ампликоны с характерным распределением по размерам.

Критические аспекты. Существует необходимость получения чистых колоний, но предварительная стадия культивирования не является необходимой. Условия роста (температура, тип питательной среды) не влияют на результат анализа. Для идентификации бактерий в продаже имеются полуавтоматические системы.

Потенциальная область применения. Генетическая экспертиза является более информативным методом для распознавания штаммов (определения характеристик ниже видового уровня), чем для идентификации видов.

3. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ВАЛИДАЦИИ

Целью данного раздела является изложение рекомендаций по валидации методик для альтернативного использования Фармакопейным микробиологическим методикам. Для выделения и идентификации микроорганизмов микробиологические лаборатории иногда используют альтернативные методики анализа по ряду причин, таких как экономичность, производительность и удобство. Валидация данных методик необходима. Некоторые указания по валидации представлены в главе *Общие сведения*, раздел 1.1, использование альтернативных методик.

При валидации альтернативных микробиологических методик должна приниматься во внимание высокая степень вариабельности, которая связана с общепринятыми методами. При проведении микробиологического испытания с помощью традиционного определения количества микроорганизмов чашечным методом, например, часто получают диапазон результатов шире, чем в обычно используемых химических испытаниях.

Когда специфическое оборудование является критичным для применения альтернативного метода, оборудование, включая компьютерное, и программное обеспечение, должны быть полностью квалифицированы следующим образом:

- квалификация дизайна (DQ) для документального подтверждения того, что конструкция оборудования является подходящей для корректного выполнения метода; должна предоставляться поставщиком оборудования;

- квалификация монтажа (IQ) для предоставления документального подтверждения, что оборудование было доставлено и установлено в соответствии с его спецификацией;

- квалификация функционирования (OQ) для документального подтверждения того, что установленное оборудование функционирует в пределах предварительно определенных норм при использовании в соответствии с инструкциями по эксплуатации;

- квалификация эксплуатации (QP) для документального подтверждения того, что оборудование, которое было установлено и эксплуатируется в соответствии с инструкциями по эксплуатации, постоянно работает в соответствии с предварительно установленными критериями и поэтому обеспечивает получение корректных результатов для данной методики. Обычно она проводится путем использования «модельной» системы (с тест-микроорганизмами) для подтверждения того, что используемые в лаборатории условия удовлетворяют требованиям критериев методики, описанным разработчиком.

Некоторые альтернативные методики зависят от использования базы данных. При валидации должен учитываться объем информации базы данных в отношении диапазона представляющих интерес микроорганизмов.

Информативность новой или модифицированной методики должна быть доказана в сравнительном исследовании официальной и альтернативной методик. Характеристики, определенные в данном разделе, должны использоваться для проведения сравнения.

3-1. ТИПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Для работ по валидации крайне важно определить часть испытания, проводимого альтернативной методикой. Например, существуют разнообразные методы для определения присутствия жизнеспособных клеток. Данные методы могут применяться в различных испытаниях (например, общее число микроорганизмов (бионагрузка), испытание на стерильность), однако полностью не могут заменить важные этапы испытания. Например, испытание на стерильность методом мембранной фильтрации может выполняться в соответствии с фармакопейной процедурой до момента объединения фильтра, подвергнутого всем указанным манипуляциям, с питательной средой, и после этого присутствие жизнеспособных клеток может быть доказано использованием некоторых альтернативных методов. В этом случае при валидации методики требуется проведение валидации используемой системы выделения микроорганизмов, а не испытания в целом.

Общие вопросы. Валидация микробиологической методики – это процесс, посредством которого экспериментально устанавливаются, что рабочие характеристики методики отвечают требованиям предполагаемой области применения. Так как микробиологические испытания имеют 3 основные области применения, требуются 3 отдельных набора валидационных характеристик. Эти вопросы описаны ниже.

3-2. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КАЧЕСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ ИЛИ ОТСУТСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

3-2-1. Правильность и точность

При прямом методе доказательства эквивалентности двух качественных методик они выполняются одновременно, и определяется степень их эквивалентности. Примером может служить сравнение испытаний на стерильность, при котором проводится сравнение доли положительных и отрицательных результатов, полученных альтернативной методикой относительно фармакопейной методики для идентичных образцов. Однако в таких случаях, как испытание на стерильность, незначительное число несовпадающих результатов потребует проведения тысяч сравнительных испытаний для установления эквивалентности методик, что может быть проблематично.

Более приемлемый способ оценки точности альтернативной качественной методики в сравнении с фармакопейной методикой заключается в получении степени согласия результатов, полученных при многократных повторях испытаний, выполняемых разными методиками на разных сериях одного и того же средства. Правильность и точность альтернативной методики могут быть выражены в относительной частоте ложноположительных и ложноотрицательных результатов, полученных новой и фармакопейной методиками с использованием стандартизованного образца, содержащего небольшое количество микроорганизмов.

Частота случаев ложноотрицательных результатов в присутствии образца для двух методик может оцениваться с использованием небольших количеств тест-микроорганизмов. Схема такого испытания похожа на стандартное бактериостатическое/фунгистатическое испытание; однако количество вносимых в образец микроорганизмов должно быть очень малым, например, около 5 КОЕ на единицу измерения. Степень контаминации должна обеспечить получение достаточно высокого количества неудовлетворительных результатов, чтобы можно было провести статистически значимое сравнение двух методик. Альтернативная методика должна обеспечивать получение такого же количества положительных результатов или выше, как и фармакопейная.

3-2-2. Специфичность

Специфичность альтернативной качественной методики заключается в ее способности обнаружить определенный диапазон микроорганизмов, которые могут присутствовать в испытуемом образце. Этот параметр адекватно оценивается путем оценки ростовых свойств питательной среды для качественных методик, которые основаны на наличии роста микроорганизмов, для того чтобы подтвердить их присутствие или отсутствие. Для методик, которые не требуют роста как индикатора микробного присутствия, оценка специфичности подтверждает, что постороннее вещество в аналитической системе не мешает испытанию. В соответствующих случаях для целей испытания в процессе валидации используются смеси микроорганизмов.

3-2-3. Предел обнаружения

Предел обнаружения альтернативной качественной методики характеризуется минимальным числом микроорганизмов в образце, которое может быть определено в установленных экспериментальных условиях. Испытание на предельное содержание микроорганизмов определяет присутствие или отсутствие микроорганизмов. С учетом природы микробиологии предел обнаружения означает число микроорганизмов, присутствующих в исходном образце до разведения или инкубации, и не относится к числу микроорганизмов, присутствующих в образце в процессе испытания.

Обе методики (альтернативная и фармакопейная) должны оцениваться с использованием инокулята, содержащего незначительное число тест-микроорганизмов, например, около 5 КОЕ на единицу измерения, с последующей оценкой обнаружения микроорганизмов. Степень контаминации посевного материала должна быть доведена до такого уровня, когда рост микроорганизмов обнаруживается фармакопейной методикой не менее чем у 50 % образцов. Необходимо провести такое определение несколько раз, поскольку предел обнаружения испытания определяется на соответствующем числе повторов (для образца не менее 5). Способность обеих методик обнаруживать присутствие единичных микроорганизмов может быть оценена с помощью критерия хи-квадрат (χ^2).

3-2-4. Робастность

Робастность альтернативной качественной методики – это степень ее способности не подвергаться влиянию малых задаваемых изменений в условиях выполнения методики. Робастность является показателем надежности методики при ее использовании в измененных стандартных условиях, таких как разные аналитики, приборы, серии реактивов и лаборатории. Робастность может быть определена как собственное сопротивление влиянию, оказываемому переменными факторами условий испытания и окружающей среды, на результаты микробиологического метода. Робастность – это та валидационная характеристика, которая определяется разработчиком методики, но если основные параметры изменены пользователем, их влияние на робастность должно быть оценено.

Робастность качественной методики оценивается по ее способности определить тест-микрорганйзмы при задаваемых изменениях условий методики.

3-3. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОБЩЕГО ЧИСЛА МИКРООРГАНИЗМОВ

3-3-1. Правильность

Правильность альтернативной количественной методики характеризуется близостью результатов испытания, полученных альтернативной методикой, к значению, полученному фармакопейной методикой. Правильность может быть доказана рядом практических испытаний. Правильность обычно выражается как процент обнаруженных микрорганйзмов с помощью методики.

Правильность может быть оценена путем приготовления суспензии микрорганйзмов на максимальном значении диапазона испытания, затем серийно разведенной до наименьшего значения диапазона испытания. Например, если считается, что альтернативный метод заменяет традиционный чашечный метод подсчета для определения числа жизнеспособных микрорганйзмов, тогда приемлемый диапазон может составлять 10^0 – 10^6 КОЕ/мл. Если альтернативной методикой заменяется НВЧ метод, может использоваться еще более узкий диапазон. Не менее 5 суспензий должны быть проанализированы в пределах диапазона испытания для каждого тест-микрорганйзма. Если подразумевается, что альтернативная методика заменит общепринятый метод, она должна обеспечивать проведение оценки жизнеспособных микрорганйзмов на уровне не менее 70 % результата, получаемого фармакопейной методикой.

Методика, используемая для проверки линейности метода (см. раздел 3-3-5), может также использоваться для проверки правильности: суспензии микрорганйзмов, приготовленные для оценки альтернативной методики, подсчитываются одновременно с использованием фармакопейной методики. Правильность считается доказанной, если результаты испытания пригодности показывают, что наклон линии регрессии существенно не отличается от 1 и если отрезок, отсекаемый на оси Y, существенно не отличается от 0.

3-3-2. Точность

Точность альтернативной количественной методики – это степень согласия результатов индивидуальных испытаний при выполнении методики на многократных испытуемых образцах однородных суспензий микрорганйзмов в установленных условиях. Обычно точность выражается в виде дисперсии, стандартного отклонения или относительного стандартного отклонения (коэффициент вариабельности) серии измерений.

Суспензия микрорганйзмов с концентрацией обычно в середине диапазона измеряется как минимум несколько раз. Число повторов определяется таким образом, чтобы протокол оценки точности был выполнен полностью в течение одной рабочей смены, т.е. при одинаковых рабочих условиях и без изменений в суспензии микрорганйзмов. Затем оценка проводится в другие рабочие смены при максимально измененных условиях (различные реактивы, исполнители, дни, и так далее). Рассчитывают дисперсию результатов, полученных в каждой рабочей смене («группе»). Если дисперсия результатов группы незначительна, может быть рассчитана дисперсия для оценки сходимости результатов. Рассчитывается межгрупповая дисперсия. Дисперсия для оценки промежуточной точности – это сумма дисперсии для сходимости и межгрупповой дисперсии. Затем вычисляются относительные стандартные отклонения (коэффициенты вариабельности). Обычно значение относительного стандартного отклонения в диапазоне от 10 % до 15 % является приемлемым. Безотносительно определенных результатов относительное стандартное отклонение, полученное для альтернативной методики, не должно превышать значение, полученное для фармакопейной методики.

3-3-3. Специфичность

Специфичность альтернативной количественной методики проверяется при использовании ряда подходящих микрорганйзмов. В определенных случаях для целей испытания в процессе валидации используют смеси микрорганйзмов.

3-3-4. Предел количественного определения

Предел количественного определения альтернативной количественной методики – это минимальное число микрорганйзмов, которое может быть точно подсчитано. Так как

невозможно получить достоверный образец, содержащий известное число микроорганизмов, необходимо, чтобы предел количественного определения рассчитывался из количества повторов, например, не менее 5. Могут быть также использованы результаты исследований линейности и правильности. При этом считается, что наименьшая концентрация в линейном диапазоне является пределом количественного определения методики. Предел количественного определения альтернативной методики не должен превышать параметры фармакопейной методики.

3-3-5. Линейность

Линейность альтернативной количественной методики – это ее способность обеспечивать получение результатов, которые пропорциональны концентрации микроорганизмов, присутствующих в образце в пределах определенного диапазона. Линейность должна определяться в пределах, соответствующих назначению альтернативной методики. Методика определения должна включать выбор разных концентраций каждого тест-микроорганизма и проведение нескольких повторов для каждой концентрации. Число повторов выбирается так, чтобы все испытание могло выполняться в течение рабочей смены. Затем другие 2 рабочие смены выполняются в условиях максимальной изменчивости (различные реактивы, исполнители, дни и так далее). После оценки однородности дисперсии результатов, полученных для каждой концентрации, рассчитывается уравнение линейной регрессии. Линейность считается подтвержденной, если рассчитанный наклон кривой значителен, и если при проверке отклонение от линейности несущественно.

3-3-6. Диапазон применения

Диапазоном применения альтернативной количественной методики является интервал между минимальным и максимальным количествами микроорганизмов, которые были определены с помощью описанной методики с надлежащей точностью, правильностью и линейностью. Диапазон применения устанавливается по результатам оценки точности, правильности и линейности.

3-3-7. Робастность

Робастность альтернативной количественной методики – это степень ее способности не подвергаться влиянию малых, задаваемых изменений в условиях выполнения методики. Робастность является показателем надежности методики при ее использовании в измененных стандартных условиях, таких как разные аналитики, приборы, серии реактивов и лаборатории. Робастность может быть определена как собственное сопротивление влиянию, оказываемому переменными факторами условий испытания и окружающей среды, на результаты микробиологического метода. Робастность – это та валидационная характеристика, которая определяется разработчиком методики, но если основные параметры изменены пользователем, их влияние на робастность должно быть оценено. Робастность количественной методики оценивается по ее способности подсчитать тест-микроорганизмы при задаваемых изменениях условий методики со статистической значимостью.

3-4. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ИСПЫТАНИЙ НА ПОДЛИННОСТЬ

Существует большое количество доказательств, что разные методики могут значительно различаться по их способности идентифицировать микроорганизмы в лекарственных средствах. Необходимо учитывать, что метод классифицирования должен быть совместимым со своей внутренней системой, но может отличаться от других способов идентификации микроорганизмов. Другими словами, идентификация штаммов, основанная на биохимической активности, может привести к одному заключению, идентификация с помощью анализа жирных кислот – к другому, идентификация с помощью ДНК-анализа – к третьему, и другие методы могут привести к альтернативным заключениям. Микробиологическая идентификация определенной системой основана непосредственно на предыдущем опыте применения данной системы и таким образом может сильно отличаться от идентификации другой системой. Крайне необходимо, чтобы каждая система обеспечивала одинаковую идентификацию штаммов из лекарственных средств.

3-4-1. Правильность

Правильность альтернативных испытаний на подлинность – это их способность определить искомым микроорганизм на требуемом таксономическом уровне и дифференцировать его от других микроорганизмов, присутствующих в образце. Правильность должна быть доказана на сериях тест-микроорганизмов, полученных из типичного образца и предварительно идентифицированных другим методом

3-4-3. Точность

Точность альтернативных испытаний на подлинность – это степень согласия результатов индивидуальных испытаний при выполнении методики на многократных испытуемых образцах суспензий микроорганизмов на всем диапазоне методики.

3-4-4. Робастность

Робастность испытаний на подлинность – это степень их способности не подвергаться влиянию малых задаваемых изменений в условиях выполнения методики. Робастность является показателем надежности методики при ее использовании в измененных стандартных условиях, таких как разные аналитики, приборы, серии реактивов и лаборатории. Робастность может быть определена как собственное сопротивление влиянию, оказываемому переменными факторами условий испытания и окружающей среды, на результаты микробиологического метода. Робастность – это та валидационная характеристика, которая определяется разработчиком методики, но если основные параметры изменены пользователем, их влияние на робастность должно быть оценено. Робастность испытаний на подлинность оценивается по их способности определить тест микроорганизмы при задаваемых изменениях условий методики.

4. ЧАСТНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ВАЛИДАЦИИ

4-1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Значение термина «валидация» приводится в различных контекстах с некоторыми различиями, но принципиально валидация определяется как процесс получения документированных доказательств того, что процесс будет единообразно удовлетворять критериям своего предназначения. Следовательно, для проведения корректной валидации новой методики крайне необходимо понять и определить критерии предназначения валидируемой процедуры.

Для общепринятых или альтернативных микробиологических методик должны быть предусмотрены два уровня валидации. Обычно первичная валидация выполняется разработчиком новой методики, в то время как валидация для фактического использования по назначению, которая представляет собой подтверждение пригодности или применимости методики в определенной ситуации, должна рассматриваться как ответственность пользователя. Перед валидацией для фактического использования по назначению пользователем проводится квалификация эксплуатации, как описано в разделе 3. *Общие требования к валидации.*

Обычно в качестве индикаторов или основы для детектирования для более общих задач в микробиологических методиках используются специфические характеристики микроорганизмов. Получаемая с помощью методики требуемая информация включает присутствие, количество, жизнеспособность, резистентность или идентификацию микроорганизмов в данном лекарственном средстве или окружающей среде.

Определенная методика обычно дает непрямой или условный ответ на вопросы. Например, общее число и жизнеспособность микроорганизмов определяются как количество микроорганизмов, способных к размножению при определенном наборе условий приготовления образца, культивирования и инкубации. В классической микробиологии размножение, соответственно, считается общим индикатором жизнеспособности. Однако существуют другие параметры, которые могут быть использованы как индикаторы жизнеспособности. Уровень АТФ, накопление или метаболизм субстратов в живых клетках также могут служить индикаторами жизнеспособности. Результаты различных методов определения жизнеспособности не всегда могут быть одинаковы. Микроорганизмы не всегда могут размножаться на данной питательной среде, но могут, тем не менее, накапливать и метаболизировать субстрат. Микроорганизмы в определенном поврежденном состоянии могут быть неспособны

аккумулировать субстрат, но могут, тем не менее, быть способны к восстановлению и размножению.

Другим примером являются различные методики, используемые для идентификации микроорганизмов. Для видовой идентификации часто используются характерные особенности метаболизма микроорганизмов, а в другой методике проводится сравнение ДНК последовательностей. Результаты, полученные с помощью различных методик, могут совпадать не полностью, и один ответ может быть пригодным для конструкции корректного филогенетического корреляционного древа, другой ответ может быть более полезным в контексте патогенности или других свойств дифференцированных микроорганизмов.

4-1-1. Первичная валидация

Принцип детектирования должен быть четко описан разработчиком, чтобы охарактеризовать определенную микробиологическую методику. Методика должна содержать подробное описание требуемых условий, необходимых материалов и оборудования и ожидаемого сигнала. Принцип применения должен быть описан в рецензируемом научном журнале.

Принцип детектирования должен быть охарактеризован на модельной системе и/или с панелью тест-микроорганизмов по крайней мере по следующим параметрам:

- предварительная обработка образца или микроорганизмов;
- тип ответа;
- специфичность ответа;
- предел определения;
- диапазон;
- линейность ответа;
- правильность и точность ответа;
- робастность методики в модельной системе;
- пределы пригодности.

Если методика была охарактеризована разработчиком по перечисленным параметрам, то принцип детектирования не подлежит проверке каждым пользователем.

4-1-2. Валидация альтернативной микробиологической методики

4-1-2-1. Анализ риск/польза

Для валидации специфических альтернативных микробиологических методик крайне важно точно описать назначение испытания. На основании назначения должны быть определены тип и объем получаемой информации. Общепринятая и альтернативная методики должны быть оценены в отношении получаемой информации и возможных ограничений и сопоставлены путем анализа отношения риск/польза.

Альтернативная методика может быть названа пригодной, если получаемая с ее помощью информация дает научно обоснованный ответ на вопросы, поставленные испытанием, и если степень ограничения применения методики не превышает ограничения стандартной методики.

4-1-2-2. Валидация фактического использования по назначению

Пользователь должен проверить, что результаты испытания, полученные с использованием альтернативной методики на его образцах, сопоставимы с результатами, полученными разработчиком в модельной системе.

По возможности должно быть оценено следующее:

- сочетаемость ответа с приготовлением образца, необходимым для испытания лекарственного средства;
- предел и диапазон детектирования методики с учетом размера имеющейся пробы;
- специфичность ответа с учетом мешающего влияния компонентов лекарственного средства;
- линейность ответа относительно всех типов испытываемых образцов;
- правильность и точность ответа относительно всех типов испытываемых образцов;
- робастность методики относительно всех типов испытываемых образцов.

Необходимо определить критерии приемлемости методики при повседневном использовании в зависимости от цели применения и валидационных данных.

4-2. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

4-2-1. Анализ риск/польза

Обширные научные данные и многолетнее использование подтверждают возможность использования АТФ как маркера жизнеспособности для обнаружения того же диапазона микроорганизмов, которые выявляются с использованием стандартных чашечных методов. Так как данный метод основан на росте микроорганизмов, его преимуществом по сравнению с чашечными методами является быстрое получение результата (от 5 дней при применении чашечных методов до 24 ч при применении биолюминесценции). Существует возможность идентифицировать микроорганизмы, обнаруживаемые биолюминесценцией, на стадии инкубирования в питательной среде, но при этом необходимо учитывать, что в смешанной культуре некоторые микроорганизмы могут угнетать рост других микроорганизмов в процессе инкубации. Этот метод позволяет оценить образцы в течение 24 ч для фильтруемых и нефилтруемых проб (вода, внутривидовой контроль, образцы окружающей среды, твердые и жидкие исходные материалы, твердые и жидкие готовые лекарственные средства и т.д.) и оценить большое количество образцов, когда стадия детектирования автоматизирована.

4-2-2. Валидация фактического использования по назначению

Метод основан на детектировании АТФ жизнеспособных микроорганизмов. Квалификация эксплуатации проводится с применением тест-микроорганизмов с целью подтверждения того, что в лабораторных условиях пользователя возможно соответствие критериям, указанным разработчиком, относительно воспроизводимости, точности и линейности (количественный метод) или предела обнаружения (качественный и полуколичественный метод) в пределах диапазона, необходимого для использования по назначению. Исходя из этой цели, валидация выполняется в три фазы:

– фаза 1: оценка ростовых свойств питательной среды в присутствии испытуемого образца (если проводится стадия инкубации);

– фаза 2: поиск мешающих воздействий, которые могут увеличивать или ингибировать образование АТФ (путем добавления стандартного раствора АТФ к испытуемому образцу);

– фаза 3: сравнительное исследование с фармакопейной методикой.

Подробный пример валидации биолюминесцентного метода приведен в конце данного раздела.

4-3. ЦИТОМЕТРИЯ (ТВЕРДОФАЗНАЯ И ПРОТОЧНАЯ) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

4-3-1. Анализ риск/польза

Обширные научные данные подтверждают способность флуоресцентного маркера жизнеспособности обнаружить и/или подсчитать более широкий диапазон микроорганизмов, чем при использовании стандартных чашечных методов. Цитометрия позволяет определить все жизнеспособные микроорганизмы, включая те, что не распознаются методами, основанными на росте. Несмотря на то, что данный метод обладает преимуществом в отношении скорости, его возможности по открываемости обнаруженных микроорганизмов ограничены. Таким образом, для дальнейшей идентификации может потребоваться обработка альтернативными флуоресцентными красителями или использование альтернативной методики. В настоящее время невозможно использовать данный метод для стандартной идентификации микроорганизмов, хотя характерные морфологические признаки легко определяются при твердофазной цитометрии с применением флуоресцентных микроскопов. Данный метод обеспечивает быструю оценку образцов и, следовательно, позволяет использование упреждающего подхода в фармацевтическом производстве, способствуя обеспечению качества производственных операций. Данный метод не зависит от роста, и, следовательно, все метаболически активные микроорганизмы будут обнаружены. Однако предел обнаружения методик проточной цитометрии не позволяет определить общее количество микроорганизмов прямым методом для большинства фармацевтических образцов. Если необходима

предварительная инкубация, оценка становится полуколичественной (испытание на предельное испытание).

4-3-2. Валидация фактического использования по назначению

Метод основан на детектировании флуоресцентного сигнала от маркированных микроорганизмов.

Квалификация эксплуатации проводится для доказательства того, что приборы работают в определенных операционных параметрах. Для этого используются флуоресцентные стандарты с требуемой интенсивностью и культуры с известным типом и количеством микроорганизмов. Этими испытаниями проверяют систему количественного определения. Для оценки пригодности повседневной методики испытания и степени влияния качества расходных материалов на получаемые результаты при валидации также должны быть проведены испытания с реактивами и расходными материалами (отрицательные контроли). Испытания на чистой культуре тест-микроорганизмов проводятся для оценки системы обнаружения и сравнения результатов испытания, полученных альтернативной методикой, с результатами, полученными с использованием стандартного определения количества микроорганизмов чашечным методом. Для оценки линейности, правильности, точности, диапазона, специфичности, предела количественного определения (количественный метод) и предела определения (проточная цитометрия с предварительной инкубационной стадией) должны использоваться многократные повторы (не менее 5) суточных культур, разведенных в пределах диапазона концентрации (например, 100 %, 75 %, 50 %, 25 % и 10 %). Так как у цитометрии высокая чувствительность (твердофазная цитометрия может обнаружить единичные клетки, тогда как проточная цитометрия чувствительна до уровня 10–50 клеток/мл), и обнаружение не основано на росте, линейность приборов может оцениваться путем сравнения фактических результатов с ожидаемым значением.

Исходя из задач, валидация выполняется в две фазы: валидация в отношении испытуемого образца и сравнительное испытание. Результаты каждой фазы должны оцениваться относительно предварительно установленных критериев приемлемости с использованием положительных и отрицательных контролей:

– *фаза 1*: для подтверждения отсутствия влияния процесса приготовления образца и самих образцов на функционирование системы обнаружения в индивидуальные материалы, оцениваемые методом цитометрии, должно быть добавлено определенное количество микроорганизмов; в частности матрица (среда) образца не должна влиять на обнаружение (то есть не должна содержать эндогенных хромофоров, автофлуоресцентных частиц), и в случае проточной цитометрии для оптимального испытания должны быть определены размер образца/разведение и скорость потока;

– *фаза 2*: должно быть проведено испытание, в котором сравниваются результаты, полученные с помощью цитометрии и фармакопейного метода; в протоколе сравнительного испытания должно быть определено число образцов и время испытания; число образцов может быть разным, но должно быть показательным процедуре оценки материала (то есть время/количество) и должно обеспечивать статистическую оценку; все образцы должны быть приготовлены в соответствии с определенными процедурами и оценены относительно выбранных валидационных характеристик и критериев приемлемости, подобных тем, что используются для оценки чистой культуры.

4.4. ПРОФИЛИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ

4-4-1. Анализ риск/польза

Идентификация с помощью профилей жирных кислот может быть более точной, чем идентификационные методы, основанные на метаболических профилях в традиционных микробиологических культурных методах. База данных охватывает больше микроорганизмов, чем традиционные культуральные методы. Для данного метода необходима предварительная инкубация, но экстракция и идентификация занимает меньше времени, чем биохимические методы, и, следовательно, результаты получаются быстрее. Другие современные методы, такие как анализ последовательности 16S рРНК или генетические «отпечатки пальцев», имеют схожий широкий диапазон дифференциации и дают результат так же быстро, как и данный метод.

Разделение близкородственных микроорганизмов (например, *E. coli* и *Salmonella* spp.) с помощью профилей жирных кислот может быть затруднительно. В случае, когда идентификация близкородственных микроорганизмов особенно важна, другие системы могут дать более точные результаты. Для использования с этой целью важно определить наиболее критичные типы микроорганизмов, подлежащие идентификации. Если требуется охарактеризовать корректные филогенетические виды изолированных микроорганизмов, методы идентификации, основанные на ДНК последовательности, дадут более точные результаты.

Ограничения идентификации с помощью профилей жирных кислот связаны также с необходимостью выращивания микроорганизмов на стандартных средах при стандартных температурных условиях и длительности инкубации. Микроорганизмы, которые невозможно культивировать на таких средах, идентифицировать нельзя.

4-4-2. Валидация фактического использования по назначению

Для подтверждения единообразия получаемых результатов проводят испытания с использованием диапазона тест-микроорганизмов и, по крайней мере, в трех повторах в каждом случае.

Как минимум должна быть проведена трехкратная идентификация каждого из достаточного количества микроорганизмов, выделяемых из типичных анализируемых пользователем образцов. Результаты в каждом случае должны быть однородны и должны совпадать с результатами идентификации, полученными с использованием альтернативных методов идентификации. При получении разных результатов идентификации с помощью другой системы идентификации причина этого несходства должна быть исследована. Различия между системами идентификации могут быть приемлемыми при наличии научно обоснованных объяснений по распознаванию различных видов. В таком случае должно быть доказано, что распознавание идентифицированных видов является робастным. Также должно быть доказано, что система не относит плохо распознанные изолированные микроорганизмы к одному «виду», симулируя таким образом повторяющуюся изоляцию единичных видов.

4-5. МЕТОДИКИ, ОСНОВАННЫЕ НА АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

4-5-1. Анализ риск/польза

МАНК широко используется в диагностике, благодаря своей точности и скорости получения результатов при относительно низкой стоимости (для анализа, но не для приборов) по сравнению с традиционными методами. При условии проведения определенных работ по валидации и надлежащего выполнения методик МАНК могут иметь ряд преимуществ в некоторых областях по сравнению с классическими методами, с другой стороны, классические методы легче стандартизируются, не требуют высококвалифицированного персонала и могут иметь низкую стоимость. Даже когда выполнение МАНК не является более трудным по сравнению с традиционными методами, интерпретация результатов обычно требует высокой степени научной компетенции.

При использовании для идентификации методов, основанных на использовании ДНК, необходимо учитывать, что они не позволяют различать мертвые и живые микроорганизмы. Это означает, что их невозможно использовать для прямого проведения испытания, и требуется пассаж на традиционной питательной среде, вследствие чего часть преимуществ в скорости испытания теряется. Более того, при использовании непосредственно в конце анализа лекарственного средства эти методы не обеспечивают получение культуры для дальнейшего исследования и могут не иметь ряд преимуществ в случае, когда обнаруживаемые микроорганизмы плохо культивируются или подвергаются стрессу. Методики амплификации РНК (например, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) могут идентифицировать живые микроорганизмы (но не споры) непосредственно в лекарственных средствах, но по сравнению с традиционными методами их более сложно использовать регулярно (в рабочем порядке). С другой стороны, при использовании специфических праймеров идентификация (или типирование) с помощью МАНК является более точной по сравнению с традиционными методами и в некоторых случаях может иметь другие преимущества: например, для идентификации некоторых

вакцин (например, вакцина для профилактики холеры, вакцина для профилактики коклюша цельноклеточная) их использование может заменять специфические сыворотки и способствовать уменьшению использования животных или обеспечить высокоспецифичную идентификацию, где она в настоящее время отсутствует (например, вакцина БЦЖ).

Как правило, данные методы являются неколичественными (ПЦР) или полуколичественными (ПЦР в реальном времени). Их результаты не могут быть сопоставлены с результатами подсчета колоний, где требуется точный подсчет присутствующих микроорганизмов в образце. Но даже если подсчет колоний имеет проверенную временем достоверность, это положение не может не подтверждаться для бактерий, которые имеют тенденцию к «сливному росту» (микобактерии) или образованию цепочек или скоплений (стрептококки, стафилококки), поэтому точная стандартизация полуколичественных методов может давать результаты сравнимой достоверности.

4-5-2. Валидация фактического использования по назначению

Данный метод валидируется в соответствии с общей статьей 2.6.21. Сравнение традиционных методологий и методологий, основанных на ПЦР, которые различаются по чувствительности и специфичности, является особенно затруднительным и может приводить к противоречивым заключениям.

Следующий пример приведен для информации и не пригоден для общего применения.

Пример валидации альтернативной методики: подробный протокол, который выполняется лабораторией для внедрения биолюминесценции

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Методы, в которых используется стадия предварительной инкубации в жидкой среде (биолюминесценция в пробирке или на микропланшете), не позволяют получить количественную информацию и обеспечивают только лишь определение присутствия/отсутствия микроорганизмов в анализируемом образце. При использовании нескольких проб разного объема может быть проведено полуколичественное определение (испытание на предельное содержание). Например, для классического испытания на определение общего количества жизнеспособных аэробных микроорганизмов в нестерильных продуктах испытываемый объем образца составляет 0,1 г или 0,1 мл. Это означает отсутствие микроорганизмов в 0,1 г или 0,1 мл при получении отрицательного результата, то есть менее 10 микроорганизмов в 1 г или 1 мл, и наличие не менее 10 микроорганизмов в 1 г или 1 мл – при положительном результате. Если испытываются одновременно 0,01 г или 0,01 мл, отрицательный результат соответствует количеству микроорганизмов менее 100 в 1 г или 1 мл. Комбинация отрицательного результата для 0,01 г или 0,01 мл и положительного результата для 0,1 г или 0,1 мл позволяет оценивать уровень контаминации продукта менее 100, но более или равно 10 микроорганизмам в 1 г или 1 мл.

Как упомянуто в разделе 2, биолюминесценция может использоваться как количественный метод, если микроорганизмы выделяют на фильтрационную мембрану и в дальнейшем инкубируют в питательной среде (биолюминесценция на мембране).

Протокол, представленный ниже, описывает подходы к валидации качественной, полуколичественной и количественной методик.

КВАЛИФИКАЦИЯ ЭКСПЛУАТАЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ МЕТОДИКИ

Специфичность

Проводят скрининг метода с тест-микроорганизмами, подходящими для данной методики. Например, для подсчета жизнеспособных аэробных микроорганизмов на нестерильных лекарственных продуктах, используют как минимум ряд микроорганизмов, описанных в статье 2.6.12 для оценки ростовых свойств питательных сред в присутствии продукта. Это определение выполняется не менее 3 раз с каждым микроорганизмом. Критерий приемлемости: все тест-микроорганизмы должны быть обнаружены во всех повторах.

Предел обнаружения (только для полуколичественного или качественного метода)

Готовят посевной материал с незначительным содержанием (около 5 КОЕ в исходном образце) каждого испытуемого микроорганизма. Выполняют анализ как минимум 5 раз фармакопейной методикой и соответствующей биOLUMИнесцентной методикой. Критерий приемлемости: возможность двух методик определять присутствие единичного микроорганизма может быть оценена с помощью метода хи-квадрат (χ^2). Альтернативная процедура: готовят серию кратных разведений суспензий микроорганизмов (например, 10 КОЕ/инокулят, 2,5 КОЕ/инокулят, 1,25 КОЕ/инокулят, 0,75 КОЕ/инокулят). Выполняют испытание на 5 независимых сериях разведений фармакопейной методикой и соответствующей биOLUMИнесцентной методикой. Определяют предел обнаружения для каждой методики. Он соответствует последнему разведению, для которого результаты положительны для всех 5 серий. Критерий приемлемости: предел обнаружения биOLUMИнесцентной методики должен быть равен или меньше предела обнаружения фармакопейной методики.

Предел количественного определения (количественный метод)

Предел количественного определения может быть оценен одновременно при определении линейности. Предел количественного определения соответствует наименьшей концентрации в выбранном диапазоне, который отвечает критериям линейности, правильности и точности. Критерий приемлемости: предел количественного определения биOLUMИнесцентной методики должен быть равен или меньше предела количественного определения фармакопейной методики.

Точность

Количественная оценка. Для каждого тест-микроорганизма выполняется как минимум 5 повторных испытаний одной посевной серии микроорганизма с концентрацией микроорганизмов, соответствующей, по крайней мере, середине диапазона. Выполняют три независимых испытания. Проводят статистический анализ для сравнения точности 2 методик или вычисляют коэффициент вариации (CV). Критерий приемлемости: CV должен составлять от 15 % до 30 % или точность двух методик должна быть одинакова при уровне риска ошибки $\alpha = 5\%$. Если точность различна, то биOLUMИнесцентная методика превосходит фармакопейную методику.

Качественная или полуколичественная оценка. Используют альтернативную процедуру, описанную для установления предела обнаружения, и учитывают частоту положительных результатов альтернативной методики параллельно с фармакопейной методикой. Критерий приемлемости: частота положительных результатов при пределе обнаружения должна составлять 100 %, и эта частота выше или эквивалентна фармакопейной методике.

Линейность

Для каждого испытуемого микроорганизма готовят 5 концентраций в диапазоне биOLUMИнесцентной методики (диапазон обычно определяется разработчиком). Параллельно образцы анализируют фармакопейной и валидируемой методиками. Повторяют это испытание еще 2 раза, чтобы получить результаты 3 независимых испытаний. Исследуют на линейную регрессию, присутствие наклона и на отсутствие согласия с критерием Фишера при $\alpha = 5\%$. Если статистический анализ невозможен, вычисляют коэффициент корреляции (R^2) и наклон между 2 методиками. Критерий приемлемости: статистический анализ может подтвердить линейную регрессию, присутствие наклона и согласие данных с риском ошибки $\alpha = 5\%$. Рассчитывают уравнение линейной регрессии $y = a + bx$, где b – наклон и a – отрезок, отсекаемый на оси. Если статистический анализ невозможен, R^2 должен быть не менее 0,9 и наклон не должен отклоняться более чем на 20 % от 1 (b между 0,8 и 1,2). Если линейность не доказана в таком широком диапазоне, диапазон может быть уменьшен, и линейность доказывается только на 3 концентрациях вместо 5.

Правильность

Количественная оценка. Правильность может быть определена с помощью данных, полученных при изучении линейности. Для каждого микроорганизма используют от 3 до 5 концентраций в пределах линейного диапазона метода. Выполняют статистический анализ

(критерий Стьюдента с риском 5 %) для исследования подобия предполагаемого наклона (значение = 1) относительно полученного наклона и для исследования подобия предполагаемого отрезка, отсекаемого на оси (значение = 0), относительно полученного отрезка, отсекаемого на оси. Например, если предполагаемый наклон – это b со стандартным отклонением $s(b)$ 0,090 с 5 % концентрациями микроорганизмов, рассчитывают $t = (b - 1) / s(b)$. Для отрезка a , отсекаемого на оси, со стандартным отклонением, эквивалентным $s(a)$, $t = (a - 0) / s(a)$. Сравнивают эти значения с коэффициентом Стьюдента при 5 % для 13 степеней свободы (3 испытания, 5 концентраций). Критерий приемлемости: если полученные значения t меньше t Стьюдента, метод является точным в применяемом диапазоне. В случае, когда не существует подобия для наклона (наклон отличается от 1) или отрезка, отсекаемого на оси (отрезок, отсекаемый на оси, отличается от 0), метод не точен на всем применяемом диапазоне.

Качественная и полуколичественная оценка. Используют альтернативную процедуру, описанную для установления предела обнаружения. Вычисляют частоту ложноотрицательных результатов для биOLUMиНесцентной и фармакопейной методик для всех испытуемых разведений. Сравнивают частоту ложноотрицательных результатов для 2 или 3 концентраций микроорганизмов несколько ниже предела обнаружения (например, 5 КОЕ/инокулят, 2,5 КОЕ/инокулят или 1,25 КОЕ/инокулят), которые дают положительный результат. По умолчанию предел обнаружения соответствует 0 % ложноотрицательных результатов. Критерий приемлемости: процент ложноотрицательных результатов для биOLUMиНесцентной методики при концентрациях микроорганизмов в пробе ниже предела определения должен быть эквивалентен или ниже такового в фармакопейной методике.

Диапазон

Это интервал между наименьшей и наибольшей концентрациями микроорганизмов при доказанных линейности, точности и правильности.

Робастность

Информация приводится разработчиком.

ВАЛИДАЦИЯ ДЛЯ ФАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПО НАЗНАЧЕНИЮ

Для приведенного примера не было необходимости определять правильность и предел обнаружения в присутствии анализируемого продукта. Валидация состоит из 3 фаз:

- фаза 1: ростовые свойства питательной среды в присутствии продукта;
- фаза 2: отсутствие у продукта мешающих воздействий, которые могут увеличивать или ингибировать образование АТФ;
- фаза 3: сравнительное исследование параллельно с фармакопейной методикой.

Эти 3 валидации проводятся в 3 независимых испытаниях с использованием, например, не менее 2 различных серий продукта.

Фаза 1: ростовые свойства питательной среды в присутствии продукта

Если известно, что у продукта высокий уровень контаминации (более 500 микроорганизмов в 1 грамме или 1 миллилитре), инкубационная стадия не требуется, допустимо непосредственное определение микроорганизмов в образце. В этом случае испытание ростовых свойств питательной среды в присутствии лекарственного средства не проводится. Однако контаминация лекарственных средств обычно намного меньше, и культивирование микроорганизмов необходимо для их обнаружения с помощью биOLUMиНесценции. Поэтому должно быть подтверждено, что продукт не ингибирует рост микроорганизмов в условиях испытания. Для этого в порции среды, содержащей продукт, отдельно добавляют суспензии каждого тест-микроорганизма в количестве не более 100 КОЕ. Для методик с биOLUMиНесценцией в пробирке или микропланшете выполняют испытание биOLUMиНесценции. Для методик с биOLUMиНесценцией на мембране ее инкубируют при температуре от 30 °C до 35 °C или от 20 °C до 25 °C в течение 5 дней и подсчитывают биOLUMиНесцентные колонии на мембране. Критерий приемлемости: результат испытания должен быть положительным (биOLUMиНесценция в пробирке или микропланшете); количественное выделение микроорганизма должно составлять не менее 70 % (биOLUMиНесценция на мембране).

Фаза 2: поиск мешающих воздействий продукта

Цель данной фазы – доказать, что лекарственное средство не увеличивает рассеянный свет или содержание немикробной АТФ (не приводит к ложноположительным результатам: критерий А) или не снижает количество обнаруживаемой АТФ (не приводит к ложноотрицательным результатам: критерий В).

Биолюминесценция в пробирке или микропланшете

А. Выполняют испытание биолюминесценции с питательным бульоном без добавок и с питательным бульоном в присутствии продукта. Определяют значение *RLU* (интенсивности сигнала люминесценции, относительные световые единицы) для питательного бульона и значение *RLU* для питательного бульона в присутствии продукта.

В. Выполняют определение биолюминесценции с питательным бульоном без добавок и с питательным бульоном в присутствии АТФ. Определяют коэффициент отклика для концентрации АТФ в процентах.

Критерии приемлемости:

– *критерий А*: значение *RLU* питательного бульона в присутствии лекарственного средства должно быть меньше удвоенного значения *RLU* питательного бульона без добавок (если критерий А не соответствует требованиям, необходимо определить индивидуальную пороговую величину для этого лекарственного средства);

– *критерий В*: значения *RLU* питательного бульона в присутствии лекарственного средства и АТФ должно находиться в пределах интервала от 25 % до 200 % значения *RLU* питательного бульона с добавлением АТФ.

Биолюминесценция на мембране: выполняют полное биолюминесцентное испытание для поиска мешающего действия. Критерий приемлемости: открываемость микроорганизмов должна быть выше или равна 70 %, но не более 200 %.

Фаза 3: сравнительное исследование продукта параллельно с фармакопейной методикой

Для того, чтобы доказать взаимосвязь между 2 методиками для испытуемого лекарственного средства выполняют 3 независимые испытания не менее двух серий анализируемого лекарственного средства валидируемой методикой параллельно с фармакопейной методикой. Результат выражают как положительный или отрицательный в определенном количестве (биолюминесценция в пробирке или микропланшете) или как количество на фильтруемый объем (биолюминесценция на мембране). Критерий приемлемости: результаты валидируемой методики должны коррелировать с фармакопейной методикой.

01/2013:50107

5.1.7. ВИРУСНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

В данной статье приведены общие требования относительно вирусной безопасности лекарственных средств, при производстве которых используется материал человеческого или животного происхождения. Так как вирусная безопасность – это сложный вопрос, важно, чтобы была проведена оценка рисков. Требования к специфическим лекарственным средствам устанавливаются компетентным органом.

В случае существования риска вирусной контаминации, при необходимости подтверждения вирусной безопасности используются дополнительные подходы, основанные на следующих аспектах:

- выбор источника материалов и испытание на вирусные контаминанты;
- исследование способности процесса производства удалять и/или инактивировать вирусы;
- исследование вирусной контаминации на соответствующих стадиях производства.

При необходимости используют одну или более валидированные процедуры для удаления или инактивации вирусов.

Более подробные рекомендации по вирусной безопасности, включая изучение валидации, представлены, в частности, в «Примечаниях к руководству по валидации исследований вирусов: разработка, проведение и интерпретация исследований валидации инактивации и удаления вирусов (CPMP/BWP/268/95)» Комитета по патентованным

лекарственным препаратам и в «Руководстве ICH Q5A: Оценка вирусной безопасности биотехнологических продуктов, полученных из клеточных линий человеческого либо животного происхождения» (включая любые последующие пересмотры этих документов).

Оценка рисков

Оценку рисков, относящихся к вирусной безопасности, проводят в случае использования материалов человеческого и животного происхождения в качестве ингредиентов лекарственных средств или при производстве фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственных средств.

Принцип оценки рисков – это рассмотрение различных факторов, способных повлиять на потенциальный уровень инфицирующих частиц в лекарственном средстве, и факторов, касающихся использования лекарственного средства, с помощью которого определяют или влияют на вирусный риск для реципиента.

При оценке рисков принимают к рассмотрению релевантные факторы, например:

- исходные виды;
- исходный орган, ткань, жидкость;
- потенциальные контаминанты с точки зрения происхождения сырья, истории донора/доноров, желательно, включая эпидемиологические данные;
- потенциальные контаминанты в процессе производства (например, из материалов группы риска, используемых при производстве);
- инвазионная способность и патогенность потенциальных контаминантов для предполагаемых реципиентов лекарственного средства с учетом способа введения лекарственного средства;
- количество материала, использованного для производства дозы лекарственного средства;
- контролирование донора/доноров, сырья при производстве, а также готового лекарственного средства;
- процесс производства лекарственного средства и его способность к удалению и/или инактивации вирусов.

Если процесс производства включает в себя стадию инактивации вирусов (например, для желатина и др., а также для средств, проходящих конечную стерилизацию паром или сухожаровую стерилизацию, как описано в общих статьях на стерильность (5.1)), оценка рисков может быть основана, главным образом, на условиях производства.

01/2013:50108

5.1.8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ВНУТРЕННЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

В статье приводятся рекомендуемые критерии приемлемости для микробиологической чистоты лекарственных средств растительного происхождения.

Присутствие некоторых микроорганизмов в нестерильных лекарственных средствах потенциально может уменьшить терапевтическую активность продукта или даже инактивировать его, кроме этого существует возможность неблагоприятного воздействия на организм пациента. Поэтому производители должны обеспечить выполнение действующего руководства по Надлежащей производственной практике при производстве, хранении и распространении лекарственных средств для гарантирования их низкой биологической загрязненности.

Микробиологическое испытание нестерильных лекарственных средств проводят в соответствии с методами, приведенными в общих статьях 2.6.12, 2.6.13 и 2.6.31. Критерии приемлемости для нестерильных лекарственных средств, основанные на общем количестве аэробов (ОКА) и на общем количестве грибов (ОКГ), приведены ниже.

Критерии приемлемости основываются на отдельных результатах или на средних результатах параллельных подсчетов в случае их проведения (например, в методах чашечного подсчета).

Перечень специфицированных микроорганизмов, для которых установлены критерии приемлемости, представлен ниже. Данный список не является обязательно

исчерпывающим, и для некоторых лекарственных средств может быть необходимым включение испытания на другие микроорганизмы в зависимости от природы исходного материала и процесса производства.

А. Лекарственные средства растительного происхождения, содержащие лекарственное растительное сырье с или без вспомогательных веществ, предназначенные для приготовления настоев и отваров с использованием кипящей воды (например, растительные чай с или без прибавленных ароматизаторов)

Общее количество аэробов (ОКА) (2.6.12)	Критерий приемлемости: 10 ⁷ КОЕ/г Максимально допустимое число: 50 000 000 КОЕ/г
Общее количество грибов (ОКГ) (2.6.12)	Критерий приемлемости: 10 ⁵ КОЕ/г Максимально допустимое число: 500 000 КОЕ/г
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Критерий приемлемости: 10 ³ КОЕ/г
<i>Salmonella</i> (2.6.31)	Отсутствие (25 г)

В. Лекарственные средства растительного происхождения, содержащие, например, экстракты и/или лекарственное растительное сырье с или без вспомогательных веществ, где метод обработки (например, экстракция) или, где применимо (в случае лекарственного растительного сырья), метод подготовки уменьшает уровни содержания микроорганизмов ниже указанных для данной категории

Общее количество аэробов (ОКА) (2.6.12)	Критерий приемлемости: 10 ⁴ КОЕ/г или КОЕ/мл Максимально допустимое число: 50 000 КОЕ/г или КОЕ/мл
Общее количество грибов (ОКГ) (2.6.12)	Критерий приемлемости: 10 ² КОЕ/г или КОЕ/мл Максимально допустимое число: 500 КОЕ/г или КОЕ/мл
Грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи (2.6.31) [#] либо бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> (2.6.13, испытание в соответствии с альтернативной методикой определения) [#]	Критерий приемлемости: 10 ² КОЕ/г или КОЕ/мл
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Отсутствие (1 г или 1 мл)
<i>Salmonella</i> (2.6.31)	Отсутствие (25 г или 25 мл)

С. Лекарственные средства растительного происхождения, содержащие, например, экстракты и/или лекарственное растительное сырье с или без вспомогательных веществ, для которых может быть показано, что метод обработки (например, экстракция этанольным раствором малой концентрации или водой, которая не кипит, или низкотемпературная концентрация) или, где применимо (в случае лекарственного растительного сырья), метод подготовки не уменьшает в значительной степени уровни содержания микроорганизмов ниже указанных критериев для категории В

Признано, что для некоторых лекарственных средств растительного происхождения критерии категорий А, В и С по общему количеству аэробов и грибов, а также грамотрицательных бактерий, толерантных к желчи, не могут быть достигнуты из-за характерного уровня микробной зараженности. В таких случаях, на основании оценки риска, которая учитывает качественные и количественные характеристики биологической загрязненности и предполагаемое использование продукта, могут быть применены более высокие критерии приемлемости.

Если показано, что ни одно из описанных испытаний не даст достоверное значение содержания микроорганизмов на необходимом уровне, используют валидированный метод с пределом обнаружения как можно более близким к заявленному критерию приемлемости.

Общее количество аэробов (ОКА) (2.6.12)	Критерий приемлемости: 10 ⁵ КОЕ/г или КОЕ/мл Максимально допустимое число: 500 000 КОЕ/г или КОЕ/мл
---	---

Общее количество грибов (ОКГ) (2.6.12)	Критерий приемлемости: 10 ⁴ КОЕ/г или КОЕ/мл Максимально допустимое число: 50 000 КОЕ/г или КОЕ/мл
Грамотрицательные бактерии, толерантные к желчи (2.6.31) #либо бактерии семейства <i>Enterobacteriaceae</i> (2.6.13, испытание в соответствии с альтернативной методикой определения)#	Критерий приемлемости: 10 ⁴ КОЕ/г или КОЕ/мл
<i>Escherichia coli</i> (2.6.31)	Отсутствие (1 г или 1 мл)
<i>Salmonella</i> (2.6.31)	Отсутствие (25 г или 25 мл)

01/2013:50109

5.1.9. РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИСПЫТАНИЯ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Цель испытания на стерильность (2.6.1), как и всех фармакопейных испытаний, заключается в предоставлении независимым аналитикам средств проверки соответствия данного материала требованиям Фармакопеи. Производителю не вменяется в обязанность проводить такие испытания и не запрещается использовать модификации установленного метода или альтернативные методы при условии, что данная продукция будет соответствовать требованиям Фармакопеи при проведении испытания с использованием официального метода.

УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

Асептические условия проведения испытания могут быть достигнуты, например, использованием камеры с ламинарным потоком воздуха класса А, расположенной в чистом помещении класса В, или с помощью изолятора.

РУКОВОДСТВО ДЛЯ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

Уровень достоверности, подтверждаемый удовлетворительным результатом испытания на стерильность (отсутствие загрязняющих единиц в образце), в отношении к качеству партии зависит от ее однородности, условий производства и эффективности принятого плана отбора проб. Для целей данного описания партия определяется как однородный набор запечатанных контейнеров, приготовленных таким образом, чтобы риск микробного загрязнения был одинаковым для каждой единицы.

Для продукции, стерилизуемой на последней стадии производства, биологически обоснованные и автоматически документированные фактические доказательства правильного протекания процесса стерилизации для всей партии дают большую гарантию по сравнению с испытанием на стерильность. Обстоятельства, при которых допустим параметрический выпуск серии, описаны в разделе 5.1.1. *Методы приготовления стерильных продуктов*. Для подтверждения асептических условий производства может применяться метод наполнения питательными средами. За исключением этих ситуаций, испытание на стерильность является единственным аналитическим методом для продукции, производство которой осуществляется в асептических условиях.

Вероятность определения наличия микроорганизмов в ходе испытания на стерильность возрастает с увеличением их количества в испытуемом образце и варьируется в зависимости от способности к росту имеющихся микроорганизмов. Вероятность обнаружения очень низких уровней микробного загрязнения, даже если оно в пределах партии является однородным, весьма мала. Интерпретация результатов испытания на стерильность основывается на предположении, что содержимое любого контейнера в партии, если он будет подвергнут испытанию, даст одинаковый результат. Поскольку очевидно, что каждый контейнер не может быть подвергнут испытанию, следует использовать соответствующий план отбора проб. В случае асептического производства рекомендуется отбирать образцы в начале и в конце выпущенной партии, а также после существенного вмешательства в технологический процесс.

НАБЛЮДЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Общепринятые микробиологические или биохимические методы в общем случае являются удовлетворительными для идентификации микроорганизмов, выделяемых в ходе испытания на стерильность. Однако, если производитель желает использовать лишь критерий (d) для признания результатов испытания на стерильность недостоверными, может оказаться необходимым использование чувствительных методов классификации для демонстрации идентичности микроорганизма, выделенного при испытании продукции, микроорганизму, выделенному из материалов и/или окружающей обстановки. Хотя с помощью рутинных микробиологических или биохимических методов может быть показано, что два изолированных штамма не являются идентичными, эти методы могут быть недостаточно чувствительными и надежными для получения однозначного доказательства того, что два штамма имеют один и тот же источник. Для определения того, что микроорганизмы имеют общее происхождение и клонально связаны, может оказаться необходимым использование более чувствительных тестов, например, молекулярной классификации по гомологии РНК/ДНК.

01/2013:50110

5.1.10. РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИСПЫТАНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

1. ВВЕДЕНИЕ

Эндо токсины, источником которых являются грамотрицательные микроорганизмы, являются наиболее распространенной причиной токсических реакций, приписываемых наличию в фармацевтических продуктах пирогенных примесей; их пирогенная активность намного выше, чем у большинства других пирогенных веществ. Эндо токсины представляют собой липополисахариды. Несмотря на то, что существует незначительное количество пирогенов другой структуры, обычно по отсутствию бактериальных эндо токсинов в продукте можно сделать вывод об отсутствии пирогенных компонентов при условии, что наличие пирогенных веществ, не относящихся к эндо токсинам, можно исключить.

Присутствие эндо токсинов в продукте может маскироваться факторами, влияющими на протекание реакции эндо токсинов с лизатом амебоцитов. Поэтому аналитик, желающий заменить требуемое в фармакопейной статье испытание на пирогенность с использованием кроликов испытанием на бактериальные эндо токсины, должен продемонстрировать, что этот тест может быть выполнен для данного продукта; при этом может оказаться необходимым выполнение процедуры удаления мешающих факторов.

Как указано в испытании на бактериальные эндо токсины (2.6.14), результаты испытания образца можно считать достоверными лишь при наличии информации по следующим двум аспектам.

– Должна быть установлена пригодность материала, используемого в испытании. Должно быть гарантировано отсутствие эндо токсинов в воде для ИБЭ и в других реактивах, а чувствительность лизата амебоцитов должна быть проверена для подтверждения чувствительности, заявленной производителем.

– В связи с тем, что испытуемый продукт может влиять на ход испытания, чувствительность лизата амебоцитов должна быть определена в присутствии и отсутствии испытуемого продукта. Между двумя значениями чувствительности не должно быть существенной разницы.

В испытании на бактериальные эндо токсины (2.6.14) указаны методы исключения мешающих факторов; в случае наличия мешающих факторов после применения этого метода должно быть проведено дополнительное испытание с целью проверки надежности удаления или нейтрализации мешающих факторов.

В данном разделе поясняются причины требований, предъявляемых в испытании на бактериальные эндо токсины, и даются указания, касающиеся регистрации и интерпретации результатов.

Замена требуемого в частной статье испытания на пирогенность с использованием кроликов на испытание с применением лизата амебоцитов фактически означает

использование альтернативного метода анализа и поэтому требует валидации; в подразделе 11 приведены некоторые указания, касающиеся практических действий в данном направлении.

Ссылка на метод, который следует применять для данного продукта, содержится в соответствующих частных статьях; если метод не указан, применяют метод А. Если используется метод, отличный от предписанного, должно быть продемонстрировано, что применяемый метод является подходящим для данного продукта и дает результат, согласующийся с результатом, получаемым предписанным методом (см. также подраздел 13).

2. МЕТОД

Несмотря на то, что добавление эндотоксинов к лизату амебоцитов в растворе может приводить к помутнению, осаждению или гелеобразованию, для определения конечной точки фармакопейного испытания первого типа использовали лишь образование гелевого сгустка. Преимуществом являлась простота принятия решения о том, выдерживает ли продукт испытание, которое определяется наличием или отсутствием гелеобразования, легко обнаруживаемым невооруженным глазом. Количественные методы С, D, E и F были разработаны позже: они требуют более сложного оборудования, но легче поддаются автоматизации для регулярного контроля большого количества образцов одного и того же продукта.

Эндотоксины могут адсорбироваться на поверхности пробирок или пипеток, выполненных из некоторых видов пластика и типов стекла. Могут возникать помехи, обусловленные высвобождением веществ из пластических материалов. Поэтому используемые материалы следует подвергать проверке; последующие партии пробирок или пипеток могут иметь несколько отличающийся состав, и поэтому рекомендуется повторять такие испытания при начале работы с новой партией материала.

Решение об использовании испытания на бактериальные эндотоксины в качестве теста на предельное содержание подразумевает, во-первых, что для испытуемого продукта должна быть определена пороговая концентрация эндотоксина и, во-вторых, что требуется определить, выше или ниже этого порога концентрация эндотоксина в испытуемом продукте. Количественные методы С, D, E и F дают возможность определить концентрацию эндотоксина в образце, но для определения соответствия Фармакопее и при рутинном контроле качества основной вопрос заключается в том, превышает ли эта концентрация установленный предел.

При установлении пороговой концентрации эндотоксина в испытуемом продукте следует уделять должное внимание дозе этого продукта: цель должна заключаться в том, чтобы гарантировать, что пока концентрация эндотоксина в продукте остается ниже такого порогового значения, даже максимальная доза, вводимая указанным путем в течение часа, не будет содержать эндотоксины в количестве, достаточном для возникновения токсической реакции.

Как в случае равенства концентрации эндотоксинов в продукте пороговому значению, так и в случае значительно больших концентраций возникает гелеобразование, и продукт не выдерживает испытание ввиду того, что характер испытания «все или ничего» делает невозможным различение концентраций, в точности равной пороговой, и более высокой. Вывод о том, что концентрация эндотоксина не превышает пороговое значение, можно сделать лишь при отсутствии гелеобразования.

Для продуктов, находящихся в твердом состоянии, такая пороговая концентрация эндотоксина на единицу массы или Международную Единицу продукта подлежит переводу в концентрацию эндотоксина в миллилитре испытуемого раствора, так как испытание может быть выполнено только с раствором. Случай, когда продукция уже находится в жидком виде (например, инфузионные жидкости), будет оговорен ниже.

Предельное содержание эндотоксинов: для фармацевтических субстанций, предназначенных для парентерального введения, определяется на основании дозы и равно:

$$\frac{K}{M},$$

где:

K – допустимая пирогенная доза эндотоксина, на килограмм массы тела;

M – максимальная рекомендованная доза продукта, на килограмм массы тела.

Если продукт вводится через малые промежутки времени или если используется в течение продолжительного периода времени, в качестве M используют максимальную общую дозу, вводимую в течение одного часа.

Предельное содержание эндотоксинов зависит от продукта и пути его введения и устанавливается в частных статьях. Предлагаемые значения K приведены в таблице 5.1.10.-1.

В случае других путей введения, критерий приемлемости для содержания эндотоксинов обычно устанавливается на основании результатов, полученных при разработке готового продукта.

Таблица 5.1.10.-1

Способ введения	K (МЕ эндотоксинов на килограмм массы тела)
Внутривенно	5,0
Внутривенно, для радиофармацевтических препаратов	2,5
Инtrateкально	0,2

Какое разведение продукта должно быть использовано в испытании для получения максимальной уверенности в том, что отрицательный результат свидетельствует о наличии концентрации эндотоксина в продукте менее предельной, а положительный результат означает, что с помощью лизата обнаруживается концентрация, равная или превышающая предельную? Такое разведение зависит от установленного предела и от чувствительности лизата: для него применяется термин «максимально допустимое разведение» (МДР), и его значение может быть рассчитано по следующей формуле:

предельное содержание эндотоксинов · концентрация испытуемого раствора

λ

Концентрация испытуемого раствора:

– в мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в массовых единицах (МЕ/мг);

– в Ед/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/Ед);

– в мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в объемных единицах (МЕ/мл);

λ – чувствительность лизата (МЕ/мл) в гель-тромб-методе, указанная на этикетке, или низшая концентрация на стандартной кривой в турбидиметрических или хромогенных методах.

В случаях, когда значение максимально допустимого разведения не является целочисленным, для рутинных целей может быть использовано подходящее целое число, меньшее МДР (что означает разведение раствора продукта в степени, меньшей, чем МДР). В таком случае отрицательный результат свидетельствует о том, что концентрация эндотоксина в продукте ниже предельного значения. Однако, когда концентрация эндотоксина в продукте в таком испытании ниже предельного значения, но достаточно высока для того, чтобы реакция с лизатом привела к образованию сгустка, испытание в таких условиях может дать положительный результат. Поэтому, когда испытание с использованием такой «удобной» степени разведения дает положительный результат, продукт следует развести до МДР и повторить испытание. В любых сомнительных или спорных случаях следует использовать МДР.

Это подчеркивает важность подтверждения чувствительности лизата.

Пример

Следует провести испытание раствора 50 мг/мл фенитоина натрия, предназначенного для внутривенного введения. МДР определяют, используя следующие значения переменных:

M – максимальная человеческая доза = 15 мг на килограмм массы тела;

c – 50 мг/мл;

K – 5 МЕ эндотоксина на килограмм массы тела;

λ – 0,4 МЕ эндотоксина на миллилитр.

$$МДР = \frac{5 \cdot 50}{15} \cdot \frac{1}{0,4} = 41,67$$

Для рутинных испытаний этого продукта может быть целесообразно 1 мл испытуемого раствора разбавить до 20 мл (величина МДР/2, округленная до ближайшего меньшего целого числа). Однако, если испытание дает положительный результат, следует 1 мл разбавить до 41,67 мл и повторить испытание. Разведение до 41,67 мл необходимо также в тех случаях, когда испытание проводится для разрешения спорной ситуации.

3. СТАНДАРТНЫЙ МАТЕРИАЛ

БСП стандартного образца эндотоксина используется в качестве стандартного образца. Его количественное определение проводят в сравнении с Международным стандартным образцом эндотоксина ВОЗ, и его активность выражается в МЕ эндотоксина в ампуле. Международная единица эндотоксина определяется как специфическая активность определенной массы Международного стандартного образца.

Для рутинных целей может быть использован другой стандартный образец эндотоксина при условии проведения его количественного определения в сравнении с Международным стандартным образцом эндотоксина или БСП, а его активность выражена в МЕ эндотоксина.

Примечание: одна Международная Единица (МЕ) эндотоксина эквивалентна одной Единице Эндотоксина (ЕЭ).

4. ВОДА ДЛЯ ИБЭ

Определение отсутствия эндотоксина в продукте путем проведения испытания на пирогенность на кроликах было исключено по практическим и теоретическим причинам:

– испытание на кроликах не обладает достаточной чувствительностью для определения эндотоксина в воде для ИБЭ, предназначенной для проведения испытаний продуктов с очень низкой предельной концентрацией эндотоксинов;

– относительно низкая точность температурной реакции у кроликов привела бы к необходимости проведения большого количества повторных испытаний;

– термины «пирогены» и «эндотоксины» относятся к группам веществ, которые не вполне совпадают друг с другом.

В описании испытания на бактериальные эндотоксины (2.6.14) указывается, что для приготовления воды для ИБЭ, кроме трехкратной дистилляции, могут быть использованы и другие методы. К хорошим результатам приводило использование метода обратного осмоса; некоторые аналитики могут предпочесть перегонять воду более трех раз. Какой бы метод ни использовался, полученный продукт не должен содержать поддающихся определению эндотоксинов.

5. ЗНАЧЕНИЕ pH СМЕСИ

Оптимальное гелеобразование смеси при проведении испытания на бактериальные эндотоксины достигается при значениях pH от 6,0 до 8,0. Однако прибавление лизата к образцу может привести к понижению pH.

6. ВАЛИДАЦИЯ ЛИЗАТА

При приготовлении растворов лизата важно следовать инструкциям производителя.

Факторы положительных конечных разведений в методах гелевого сгустка А и В переводят в логарифмы. Причина этого заключается в том, что если построить график

частотного распределения этих логарифмических значений, то он обычно намного ближе к кривой нормального распределения, чем частотное распределение самих факторов разведения; фактически они настолько близки, что допускается использование нормального частотного распределения в качестве математической модели и вычисление границ доверительного интервала с помощью *t*-критерия Стьюдента.

7. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ НА МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Некоторые продукты не могут быть подвергнуты испытанию на наличие эндотоксинов непосредственно, так как они не смешиваются с реактивами, не могут быть доведены до рН 6,0–8,0 или являются ингибиторами или активаторами гелеобразования. Поэтому требуется проведение предварительного испытания для проверки наличия мешающих факторов; в случае их обнаружения должно быть продемонстрировано, что процедура их удаления была эффективной.

Цель предварительного испытания состоит в проверке нулевой гипотезы о том, что чувствительность лизата в присутствии продукта существенно не отличается от чувствительности лизата в его отсутствии. В методах А и В используется простой критерий: нулевая гипотеза принимается, если чувствительность лизата в присутствии продукта составляет не менее 50 % и не более 200 % чувствительности самого лизата. В соответствии с классическим подходом следует вычислить среднее значение логарифма коэффициента разведения для чувствительности в присутствии и отсутствии продукта и оценить разницу между двумя средними значениями с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Испытание на мешающие факторы в методах гелевого сгустка А и В требует использования образца продукта, в котором отсутствуют эндотоксины в поддающейся определению концентрации. Это представляет собой теоретическую проблему при испытании абсолютно новых продуктов. Поэтому для количественных методов С, D, E и F был разработан другой подход.

8. ИСКЛЮЧЕНИЕ МЕШАЮЩИХ ФАКТОРОВ

Методика удаления мешающих факторов не должна приводить к уменьшению или увеличению количества эндотоксинов в испытуемом продукте (например, вследствие адсорбции). Корректный способ проверки этого состоит в применении методики к обогащенному образцу продукта, т.е. к образцу, к которому было добавлено известное количество эндотоксина, с дальнейшим измерением его открываемости.

Методы С и D. Если помехи обусловлены природой анализируемого продукта и не могут быть исключены классическими методами, может оказаться возможным построение стандартной кривой с использованием продукта того же типа, разбавленного или обработанного соответствующим образом для очистки от эндотоксинов. Испытание на эндотоксины может быть проведено с использованием полученной кривой.

Определено, что в большинстве случаев ультрафильтрация с использованием асимметрических мембранных фильтров из триацетата целлюлозы приводит к адекватным результатам. Фильтры должны пройти соответствующую валидацию в связи с тем, что производные целлюлозы (β -D-глюканы) при некоторых обстоятельствах могут обусловить получение ложных положительных результатов.

Установлено, что полисульфоновые фильтры являются непригодными, так как при их использовании были получены ложные положительные результаты.

[#]В частных статьях должно быть указание о присутствии мешающих факторов и приведена методика их устранения.[#]

9. ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ

Цель контроля, содержащего воду для ИБЭ и стандартный образец эндотоксина с концентрацией в два раза превышающей чувствительность лизата, указанную на этикетке, состоит в проверке активности лизата в условиях испытания во время его проведения. Целью отрицательного контроля является подтверждение отсутствия поддающейся определению концентрации эндотоксина в воде для ИБЭ.

Положительный контроль, в котором содержится испытуемый продукт в концентрации, используемой при проведении испытания, предназначен для демонстрации отсутствия мешающих факторов в условиях испытания во время его проведения.

10. РЕГИСТРАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Незначительные количества эндотоксина в воде для ИБЭ или в любом другом реагенте или материале, с которым лизат находится в контакте в ходе испытания, могут не определяться до тех пор, пока они не достигнут предела чувствительности лизата. Однако они могут увеличить количество эндотоксина в растворе, содержащем испытуемый продукт, до значения, слегка превышающего предел чувствительности, и вызвать положительную реакцию.

Риск, что это произойдет, может быть уменьшен путем проверки воды для ИБЭ и других реагентов и материалов с использованием наиболее чувствительного лизата из имеющихся в наличии или, по крайней мере, более чувствительного, чем лизат, использующийся при проведении испытания продукта. Даже в этом случае риск такого «ложного положительного результата» не может быть полностью исключен. Следует, однако, понимать, что в этом отношении методика испытания является безопасной, в отличие от методики испытания, допускающей ложный отрицательный результат, который может привести к выпуску недоброкачественного продукта, опасного для здоровья пациента.

11. ЗАМЕНА ИСПЫТАНИЯ НА ПИРОГЕННОСТЬ НА КРОЛИКАХ ИСПЫТАНИЕМ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

В частных статьях, касающихся фармацевтической продукции, предназначенной для парентерального применения, которая может содержать токсические количества бактериальных эндотоксинов, содержатся требования о проведении испытания либо на бактериальные эндотоксины, либо на пирогенность с использованием кроликов. В общем случае:

- в любой частной статье при необходимости проведения подобного испытания содержится только один тест – либо на пирогенность, либо на бактериальные эндотоксины;
- при отсутствии доказательств обратного испытание на бактериальные эндотоксины является предпочтительным по отношению к испытанию на пирогенность, так как обычно оно обеспечивает равную или лучшую защиту пациента;

- перед включением испытания на бактериальные эндотоксины в частную статью должны быть получены доказательства того, что один из методов, описанных в разделе 2.6.14, является подходящим для испытания данного продукта;

- необходимую информацию предоставляют производители; приветствуется предоставление компаниями любых имеющихся подтвержденных данных, касающихся применимости испытания на бактериальные эндотоксины к интересующим субстанциям и готовым формам; к таким данным относятся методы подготовки образцов и процедуры, необходимые для исключения мешающих факторов; кроме того, должны быть предоставлены любые доступные параллельные данные по проведению испытания на пирогенность с использованием кроликов, которые могли бы подтвердить возможность замены испытания на пирогенность тестом на бактериальные эндотоксины.

Дополнительные требования приведены в следующих подразделах.

12. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИСПЫТАНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ, ОТЛИЧНОГО ОТ ПРЕДПИСАННОГО В ЧАСТНОЙ СТАТЬЕ

Если в частной статье предписывается проведение испытания на бактериальные эндотоксины и не указан ни один из методов (A–F), описанных в разделе 2.6.14, то для данного продукта была подтверждена пригодность метода A (предельное испытание методом гелевого сгустка). Если указан один из других методов (B–F), то для этого продукта была подтверждена пригодность указанного метода.

13. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕТОДОВ

Замену испытания на пирогенность на кроликах тестом на бактериальные эндотоксины, а также замену установленного или подразумеваемого метода определения бактериальных эндотоксинов другим следует считать использованием альтернативного метода взамен фармакопейного испытания. Общее положение по использованию альтернативного метода взамен фармакопейного теста приведено в разделе «Общие положения»:

«Описанные испытания и методики количественного определения являются официальными методами, на которых основаны стандарты Фармакопеи. По соглашению с компетентными органами в целях контроля могут использоваться альтернативные методы анализа при условии, что используемые методы позволяют сделать определенное заключение о том, может ли быть достигнуто согласие со стандартами статей, если бы были использованы официальные методы. В сомнительных и спорных случаях единственными надежными методами считают методы, приведенные в Фармакопее».

Для валидации метода испытания на бактериальные эндотоксины, отличного от подразумеваемого или указанного в частной статье, предлагаются следующие процедуры.

13-1. Процедура, материалы и реагенты, используемые при проведении испытания с применением лизата амебоцитов, должны пройти валидацию в соответствии с указаниями, приведенными в испытании на бактериальные эндотоксины.

13-2. Должно быть проведено испытание на наличие мешающих факторов (и, при необходимости, процедура по их исключению) на образцах, отобранных по меньшей мере из трех партий продукции. Следует иметь в виду, что в методах D и E, использующих хромогенный пептид, требуются реагенты, не используемые в методах A, B, C и F, и поэтому соответствие методов A, B, C и F требованиям, предъявляемым к мешающим факторам, не может быть без соответствующего подтверждения экстраполировано на методы D и E.

14. ВАЛИДАЦИЯ ИСПЫТАНИЯ ДЛЯ НОВЫХ ПРОДУКТОВ

Процедуры, описанные в пунктах 13-1 и 13-2, должны быть выполнены для всех новых продуктов, предназначенных для парентерального применения, которые, в соответствии с требованиями Фармакопеи, должны быть подвергнуты испытанию на наличие бактериальных эндотоксинов.

5.2. ОБЩИЕ ТЕКСТЫ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРОДУКТАМ

01/2013:50201

5.2.1. ОБЩЕПРИНЯТАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ В СТАТЬЯХ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ

В некоторых пунктах настоящей статьи в скобках приведены альтернативные термины.

Система посевного материала (эталонный банк культур микроорганизмов) [*seed-lot system*]. Это система, в соответствии с которой последовательные партии (серии) продукции производятся из одного и того же главного посевного материала. Для рутинного производства из главного посевного материала может быть приготовлен рабочий посевной материал (рабочий банк культур клеток). Происхождение и количество пассажей главного посевного материала и рабочего посевного материала регистрируется.

Главный посевной материал (контрольный банк культур микроорганизмов) [*master seed-lot*]. Культура микроорганизмов, распределенная из общей массы по контейнерам, которые обрабатываются вместе в рамках одной операции таким образом, чтобы обеспечить единообразие, стабильность и предотвратить контаминацию. Главный посевной материал в жидком виде хранится обычно при температуре не выше -70°C . Лиофильно высушенный главный посевной материал хранится при температуре, обеспечивающей его стабильность.

Рабочий посевной материал (рабочий банк культур микроорганизмов) [*working seed-lot*]. Культура микроорганизмов, полученная из главного посевного материала и

предназначенная для использования в производстве. Рабочий посевной материал помещают в контейнеры и хранят, как описано выше для главного посевного материала.

Система банка клеток (система посевных клеточных культур) [*seed-bank system (cell-seed system)*]. Это система, по которой последующие конечные серии (партии) продукта произведены из культуры клеток из одного и того же главного банка клеток. Для приготовления рабочего банка клеток используется некоторое число контейнеров из главного банка клеток. Систему банка клеток валидируют на максимально допустимый пассажный уровень, который может использоваться при текущем производстве.

Главный банк клеток (главный банк посевных клеточных культур) [*master cell bank (master cell seed)*]. Культура клеток, распределенная из общей массы по контейнерам, которые обрабатываются вместе в рамках одной операции таким образом, чтобы обеспечить единообразие, стабильность и предотвратить контаминацию. Главный банк клеток хранится обычно при температуре не выше -70°C .

Рабочий банк клеток (рабочий банк посевных клеточных культур) [*working cell bank (working cell seed)*]. Культура клеток, полученная из контрольного банка и используемая в производстве перевиваемых линий клеток. Рабочий банк клеток помещают в контейнеры и хранят, как описано выше для главного банка клеток.

Исходные (первичные) культуры клеток [*primary cell cultures*]. Культуры клеток, полученные путем трипсинации подходящей ткани или органа. Клетки практически полностью идентичны клеткам ткани, из которой они были получены, и подвергаются не более чем 5 пассажам *in vitro* из исходного образца ткани животного.

Линии клеток (культуры клеток) [*cell lines*]. Культуры клеток, обладающие высокой способностью к размножению *in vitro*. В линиях диплоидных клеток клетки обладают практически теми же характеристиками, что и клетки ткани, из которой получена линия. В непрерывных линиях клеток клетки способны неограниченно размножаться в культуре и могут быть получены из здоровой или опухолевой ткани. Некоторые непрерывные линии клеток при определенных условиях обладают онкогенным потенциалом.

Производственная культура клеток [*production cell culture*]. Культура клеток, предназначенная для использования в производстве; может быть получена из одного или нескольких контейнеров рабочего банка клеток или может представлять собой исходную культуру клеток.

Контрольные клетки [*control cells*]. Некоторое количество производственных клеток, не подвергшихся заражению вирусом и использующихся в качестве неинфицированной культуры клеток. Неинфицированные клетки инкубируются в тех же условиях, которые используются для производственной культуры клеток.

Однократный сбор [*single harvest*]. Материал, полученный однократно или многократно из одной производственной культуры клеток, зараженной одним рабочим посевным материалом, или суспензия, полученная из рабочего посевного материала, инкубированная и собранная за один производственный цикл.

Моновалентный объединенный сбор [*monovalent pooled harvest*]. Объединенный материал, содержащий один штамм, тип микроорганизма или антиген и полученный из некоторого количества яиц, контейнеров с клеточными культурами и т.п., которые обрабатываются одновременно.

Готовая нерасфасованная вакцина [*final bulk vaccine*]. Продукт, прошедший все стадии производства, кроме конечного заполнения (упаковки). Он состоит из одного или нескольких моновалентных объединенных сборов из культур одного или нескольких видов микроорганизма после очистки, растворения или добавления какого-либо активизирующего или другого вспомогательного вещества. Он обрабатывается для обеспечения его гомогенности и используется для заполнения контейнеров одной или нескольких конечных партий (серий).

Конечная партия (серия) [*final lot (batch)*]. Совокупность укупоренных конечных контейнеров или других конечных единиц дозирования, которые считаются гомогенными и равнозначными в отношении риска заражения во время заполнения или приготовления конечной продукции. Единицы дозирования заполняются или готовятся другим способом из одной и той же готовой нерасфасованной вакцины, при необходимости лиофильно

высушиваются и запечатываются в рамках одного непрерывного рабочего процесса. Они имеют отличительный номер или код, идентифицирующий конечную партию (серию). Если готовая нерасфасованная вакцина разливается и/или лиофильно высушивается в рамках нескольких рабочих процессов, это приводит к появлению связанных конечных партий (серий), которые обычно идентифицируются при помощи использования общей части в отличительном номере или коде; эти связанные конечные партии (серии) иногда называются подсериями, подпартиями или фасовочными партиями.

Комбинированная вакцина [combined vaccine]. Многокомпонентный препарат с рецептурой, при которой одновременно вводятся различные антигены. Различные антигенные компоненты предназначены для защиты от разных штаммов или типов одного и того же организма и/или различных организмов. Комбинированная вакцина может поставляться производителем как один жидкий или лиофильно высушенный препарат или как несколько составляющих с инструкцией по смешиванию перед применением.

01/2013:50202

5.2.2. СТАИ КУР, НЕ ИМЕЮЩИХ КОНКРЕТНЫХ ПАТОГЕНОВ И ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИН

В случае, где это указано, цыплята, эмбрионы или культуры клеток, используемые при производстве или контроле качества вакцин, получают из яиц кур, не зараженных конкретными патогенами (НЗКП, *SPF – free from specified pathogens*). Статус *SPF* стаи кур обеспечивается посредством описанной ниже системы. Приведенный список микроорганизмов основан на имеющихся знаниях и при необходимости будет обновляться.

Под стаей понимается группа птиц, проживающих в одном и том же окружении, за которыми ухаживают лица, не имеющие контакта с зараженными конкретными патогенами стаями. Как только стае присваивают категорию *SPF*, к ней не добавляют птиц, не имеющих категории *SPF*.

Стаю содержат в таких условиях, чтобы свести к минимуму вероятность контаминации. Ее нельзя размещать вблизи стай птиц, не имеющих категорию *SPF*, за исключением стай, подготавливаемой к процессу присвоения категории *SPF*-стаи или содержащейся в условиях, соответствующих условиям содержания *SPF*-стаи. Стая должна содержаться в изоляторе или в здании с фильтруемым воздухом, поступающим под положительным давлением. Следует также принять соответствующие меры для предотвращения доступа грызунов, диких птиц, насекомых и лиц, не имеющих соответствующего разрешения.

Персонал, имеющий разрешение на вход в помещение, не должен иметь контакта с другими птицами или агентами, которые могут инфицировать стаю. Перед входом в контролируемые помещения персоналу рекомендуется принимать душ и переодеваться или надевать защитную одежду.

Во всех возможных случаях предметы, которые вносят в помещение, стерилизуют. В частности, корм рекомендуется обрабатывать соответствующим образом, чтобы избежать попадания в него нежелательных микроорганизмов, а вода должна отвечать требованиям питьевой воды, обрабатываемой, например, хлорированием. Птицам из *SPF*-стаи не вводят лекарственные средства, которые могли бы помешать распознаванию болезни в стае.

Данные об общем здоровье стаи постоянно регистрирую, все любые отклонения исследуют. Основные параметры наблюдения включают заболеваемость, смертность, общее физическое состояние, потребление корма, ежедневная яйценоскость и качество яиц, плодовитость и выводимость цыплят. Записи хранят не менее 5 лет. О любых отклонениях от нормы в исследуемых параметрах или об обнаружении какой-либо инфекции сообщается потребителям яиц в возможно короткие сроки.

Испытания или комбинации тестов, описанные ниже, должны обладать соответствующей специфичностью и чувствительностью к соответствующим серотипам вирусов. Образцы для испытаний отбираются случайным образом.

Положительный результат на наличие вируса анемии цыплят (ВАЦ) не обязательно исключает использование материала, полученного из стаи, но живые вакцины для

применения у птиц в возрасте менее 7 дней должны производиться с использованием материала от птиц с отрицательной реакцией на ВАЦ. Инактивированные вакцины для применения на птицах в возрасте менее 7 дней могут быть произведены из материала, полученного из стаи, не давшей отрицательную реакцию на ВАЦ, при условии подтверждения возможности инактивации ВАЦ в процессе инактивации вакцины.

СОЗДАНИЕ СТАИ КАТЕГОРИИ *SPF*

Будущую *SPF*-стаю создают из птиц, проверка которых показала отсутствие вертикально передающихся инфекций, возбудители которых приведены в таблице 5.2.2.-1. Проверка проводится на 2 поколениях птиц, предшествующих формированию *SPF*-стаи. Общая схема процедуры получения и поддержания *SPF*-стаи схематически приведена в таблице 5.2.2.-2. Для формирования новой *SPF*-стаи проводят ряд испытаний на 3 поколениях птиц. Все птицы в первом поколении должны быть проверены по крайней мере один раз до достижения возраста 20 недель на наличие группового антигена лейкоза птиц и отсутствие антител к вирусу лейкоза птиц подтипов А, В и J с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) или реакции нейтрализации вируса (РН). Также все птицы проверяются на отсутствие антител к инфекционным возбудителям, передающимся вертикально, согласно таблице 5.2.2.-1. Начиная с возраста 8 недель, создаваемые стаи проверяют на отсутствие *Salmonella*. Клинические наблюдения стаи проводят, начиная с 8 недель; симптомы инфекционных заболеваний у птиц должны отсутствовать. Методы анализа, используемые для оценки формируемой стаи, указаны в таблице, дополнительные рекомендации также приведены в разделе по стандартной проверке *SPF*-стаи. Начиная с возраста 20 недель, стаю проверяют в соответствии с разделом «Стандартная проверка *SPF*-стаи». Все стадии этого режима также применяют к последующим 2 поколениям, за исключением проверки каждой птицы на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем. Все результаты испытаний должны показать отсутствие патогенных микроорганизмов во всех 3 поколениях стаи, из третьего поколения которой будет сформирована *SPF*-стая.

Таблица 5.2.2.-1

Возбудитель	Проводимые исследования**	Вертикальный путь передачи	Быстрое/медленное распространение
Аденовирусы птиц, группа 1	РДП, ИФА	да	медленное
Вирус энцефаломиелита птиц	РДП, ИФА	да	быстрое
Вирус инфекционного бронхита птиц	РТГА, ИФА	нет	быстрое
Вирус инфекционного ларинготрахеита птиц	РН, ИФА	да	медленное
Вирус лейкоза птиц	ИФА для вируса, РН, ИФА для антитела	нет	медленное
Вирус нефрита птиц	ИО	да	медленное
Орторевовирусы птиц	ИО, ИФА	да	медленное
Вирус ретикулоэндотелиоза птиц	РДП, ИФА	да	медленное
Вирус анемии цыплят	ИО, ИФА, РН	да	медленное
Вирус синдрома снижения яйценоскости	РТГА, ИФА	да	медленное
Вирус инфекционного бурсита птиц	Серотип 1: РДП, ИФА, РН Серотип 2: РН	нет	быстрое
Вирус гриппа А	РДП, ИФА, РТГА	нет	быстрое
Вирус болезни Марека	РДП	нет	быстрое
Вирус болезни Ньюкасла	РТГА, ИФА	нет	быстрое
Вирус ринотрахеита индеек (птиц)	ИФА	нет	медленное
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	РА и РТГА для подтверждения положительного теста, ИФА, РТГА	да	медленное

<i>Mycoplasma synoviae</i>	РА и РТГА для подтверждения положительного теста, ИФА, РТГА	да	быстрое
<i>Salmonella pullorum</i>	РА	да	медленное

РА – реакция агглютинации;

РДП – реакция диффузной преципитации в геле; данный метод применим для еженедельных исследований;

ИФА – иммуноферментный анализ;

РТГА – реакция торможения гемагглютинации;

ИО – иммуноокрашивание;

РН – реакция нейтрализации вируса.

** По согласованию с компетентным уполномоченным органом возможно использование других типов методов при условии, что они не менее чувствительны и специфичны, чем указанные.

Таблица 5.2.2.-2

Схематическое описание процедуры присвоения и поддержания у стаи категории SPF

НОВЫЕ ПТИЦЫ	Определяют отсутствие возбудителей, передающихся вертикальным путем
	Не позднее 20 недель жизни проверяют всех птиц на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к нему
	Начиная с 8 недели жизни, проводят исследование на наличие <i>Salmonella</i> spp. и проводят общие клинические исследования
	Начиная с 20-недельного возраста, проводят стандартные исследования на наличие определенных возбудителей
ВТОРОЕ ПОКОЛЕНИЕ	Не позднее 20 недель жизни проверяют всех птиц на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к нему
	Начиная с 8 недели жизни, проводят исследование на наличие <i>Salmonella</i> spp. и проводят общие клинические исследования
	Начиная с 20-недельного возраста, проводят стандартные исследования на наличие определенных возбудителей
	Не позднее 20 недель жизни проверяют всех птиц на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к нему
ТРЕТЬЕ ПОКОЛЕНИЕ	Начиная с 8 недели жизни, проводят исследование на наличие <i>Salmonella</i> spp. и проводят общие клинические исследования
	Если результаты всех исследований являются удовлетворительными, стаю присваивают категорию SPF
ТРЕТЬЕ ПОКОЛЕНИЕ	Начиная с 20-недельного возраста, проводят стандартные исследования на наличие определенных возбудителей
	Проведение исследований после яйцекладки на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем
ПОСЛЕДУЮЩИЕ ПОКОЛЕНИЯ	Проверяют две 5 % выборки птиц в возрасте 12 и 20 недель на отсутствие вируса лейкоза птиц и антител к определенным инфекционным возбудителям
	Начиная с 8 недели жизни, проводят исследование на наличие <i>Salmonella</i> spp. и проводят общие клинические исследования
	Начиная с 20-недельного возраста, проводят стандартные исследования на наличие определенных инфекционных возбудителей
	Проведение исследований после яйцекладки на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем

В стаю можно добавлять эмбрионы SPF-кур, полученные из другой SPF-стаи, содержащейся в отдельных помещениях на той же птицеферме. Начиная с возраста 8

недель, эти введенные на замену птицы считаются стаей и подвергаются исследованиям в соответствии с процедурами, описанными выше.

ИСХОДНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ ПОСЛЕДУЮЩИХ ПОКОЛЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СТАЙ КАТЕГОРИИ *SPF*

При условии, что стая получала замены исключительно из стаи, имеющей категорию *SPF*, новое поколение предварительно проверяется для того, чтобы получить категорию *SPF*. В дополнение к исследованиям на наличие *Salmonella* и контролю общего состояния здоровья и функционирования стаи, начиная с возраста 8 недель, необходимо провести дополнительные исследования, описанные далее. Исследования проводятся на двух 5 % выборках из стаи (не менее 10 и не более 200 птиц); птицы отбираются в возрасте 12–16 недель и 16–20 недель с интервалом не менее 4 недели.

Все образцы отбирают и проверяют индивидуально. Отбирают образцы крови для исследований на наличие антител и подходящие образцы для проведения теста на наличие вируса лейкоза. Используемые методики контроля должны выполняться в соответствии с разделом

«Стандартная проверка *SPF*-стаи». При результатах всех исследований, подтверждающих отсутствие каких-либо инфекций, новому поколению присваивается категория *SPF*.

СТАНДАРТНАЯ ПРОВЕРКА *SPF*-СТАИ

Общий осмотр и патологоанатомическое исследование. Клинические исследования проводят не реже одного раза в неделю в течение жизни стаи для подтверждения отсутствия вируса сифилиса домашней птицы и признаков какой-либо инфекции. В случае превышения уровня смертности более чем 0,2 % в неделю проводят вскрытие по возможности всех погибших птиц, чтобы подтвердить отсутствие признаков какой-либо инфекции. При необходимости для подтверждения диагноза проводят гистопатологические и/или микробиологические/вирусологические исследования. Проводят специальное исследование на наличие признаков туберкулеза; гистологические образцы из мест поражения подвергаются специфической окраске для подтверждения отсутствия *Mycobacterium avium*. Содержимое слепой кишки всех погибших птиц по возможности подвергают микробиологическому исследованию на наличие *Salmonella* spp. при помощи методов, описанных ниже. При необходимости могут быть объединены образцы содержимого слепой кишки 5 птиц.

*Культуральный метод на наличие микроорганизмов вида *Salmonella* spp.* Культуральный метод на наличие *Salmonella* spp. проводят на смывах из прямой кишки, или испражнениях птиц или мазках, полученных с помощью ректального тампона. При анализе испражнений или смывов каждые 4 недели исследуют 60 образцов в течение всей жизни стаи. Для проведения исследования можно объединять до 10 образцов. При анализе мазков отбирают не менее двух образцов, исследования проводят каждые 4 недели в течение всей жизни стаи. Для обнаружения *Salmonella* spp. эти образцы предварительно обогащают, затем культивируют на питательных средах, селективных для *Salmonella*.

Исследование на наличие антигена вируса лейкоза птиц. До начала яйцекладки проводят исследования ректальных смывов или образцов крови (высеивается светлый слой кровяного сгустка) на наличие специфических групповых антигенов лейкоза. В общей сложности образцы отбирают от 5 % (не менее 10, не более 200 птиц) стаи каждые 4 недели. Во время яйцекладки образцы белка отбирают из 5 % (не менее 10, не более 200) всех яиц и исследуют каждые 4 недели. Исследования на наличие групповых специфических антигенов вируса лейкоза птиц проводят методом ИФА, используя методики, обеспечивающие обнаружение антигена из подгрупп А, В и J.

Исследование на наличие антител к другим инфекционным возбудителям. Исследования на наличие антител ко всем инфекционным возбудителям, перечисленным в таблице 5.2.2.-1, проводят в течение всего периода яйцекладки стаи. Каждые 4 недели образцы отбирают у 5 % (не менее 10, не более 200) птиц стаи. Рекомендуется проведение еженедельной проверки 1,25 % стаи, так как некоторые исследования на отдельные возбудители должны проводиться каждую неделю. В таблице 5.2.2.-1 приведена

классификация возбудителей на быстро распространяющиеся в стае и медленно распространяющиеся или, возможно, не заражающие всю стаю. На наличие медленно распространяющихся возбудителей каждый образец проверяют индивидуально. На наличие быстро распространяющихся возбудителей индивидуально проверяют не менее 20 % образцов, отбираемых каждые 4 недели; при использовании реакции нейтрализации сыворотки или твердофазного иммуоферментного анализа все образцы могут быть исследованы индивидуально или объединены по 5 образцов, отобранных одновременно. Методы, пригодные для обнаружения возбудителей, приведены в таблице 5.2.2.-1. По согласованию с компетентным уполномоченным органом возможно использование других типов тестов при условии, что они не менее чувствительны и специфичны, чем указанные.

ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРОВОДИМЫЕ В КОНЦЕ ПЕРИОДА ЯЙЦЕКЛАДКИ

После последнего сбора яиц проводят заключительные исследования, чтобы подтвердить отсутствие возбудителей, передающихся вертикальным путем, указанных в таблице 5.2.2.-1. После последнего сбора яиц не менее 5 % стаи (не менее 10, не более 200 птиц) отбирают для проведения исследований по крайней мере в течение 4 недель. Образцы крови отбирают у каждой птицы в группе во время 4-недельного периода, при этом по крайней мере у 1,25 % птиц (25 % образцов) образцы отбирают не ранее чем через 4 недели после заключительного сбора яиц. Образцы сыворотки проверяют на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем (таблица 5.2.2.-1), с помощью указанных методов. Если отбор образцов осуществляют еженедельно, исследованию в этот период подвергают не менее 1,25 % птиц (25 % образцов). В качестве альтернативы в течение 4 недель после заключительного сбора яиц кровь и/или другие подходящие для исследований материалы отбирают по крайней мере у 5 % стаи и исследуют на наличие возбудителей, передающихся вертикальным путем, с помощью валидированных методик на основе амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21).

ДЕЙСТВИЯ, КОТОРЫЕ ДОЛЖНЫ БЫТЬ ПРЕДПРИНЯТЫ В СЛУЧАЕ ОБНАРУЖЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ

Если обнаружено заражение стаи возбудителем, относящимся согласно таблице 5.2.2.-1 к медленно распространяющимся, все материалы, полученные из стаи в течение 4 недель, предшествующих дате отбора образца с наличием возбудителя, считаются неудовлетворительными. Аналогично, если обнаружено заражение стаи возбудителем, относящимся согласно таблице 5.2.2.-1 к быстро распространяющимся, все материалы, полученные из стаи в течение 2 недель, предшествующих дате отбора образца с наличием возбудителя, считаются неудовлетворительными. Любой продукт, произведенный с использованием таких материалов, и для которого обязательно использование материалов *SPF*, считают непригодным и бракуют; все испытания по контролю качества, проведенные с использованием таких материалов, являются недействительными.

Производители обязаны уведомить потребителей всех яиц об обнаружении заражения как можно скорее после вспышки эпидемии.

Любая стая, для которой подтверждено заражение любым определенным возбудителем, не может повторно получить категорию *SPF*. Любое потомство стаи, полученное во время или после 4-недельного периода до последнего отрицательного образца, не может быть отнесено к категории *SPF*.

01/2013:50203

5.2.3. КЛЕТКИ-ПРОДУЦЕНТЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Данный общий раздел распространяется на линии диплоидных клеток и непрерывные линии клеток, используемые в качестве клеток-продуцентов в производстве вакцин для медицинского применения; специфические вопросы, связанные с вакцинами, приготовленными при помощи технологии рекомбинантной ДНК, описываются в общей статье *Продукты технологии рекомбинантной ДНК*. В таблице 5.2.3.-1 указаны испытания,

которые должны проводиться на различных этапах (посевная культура клеток, главный банк клеток, рабочий банк клеток, клетки на максимальном уровне удвоения популяции или выше, используемом при производстве). Общие условия использования культур и методов исследования приведены ниже. Требования по использованию в производстве отдельных вакцин первичных клеток или клеток, подвергшихся нескольким пассажам без создания банка культуры клеток, приводятся в частных фармакопейных статьях.

Линии диплоидных клеток (диплоидные штаммы клеток) [*diploid cell lines*]. Линия диплоидных клеток обладает высокой, но ограниченной способностью размножения *in vitro*.

Непрерывные линии клеток (перевиваемые линии клеток) [*continuous cell lines*]. Непрерывные (перевиваемые) линии клеток обладают способностью неограниченного размножения *in vitro*; клетки зачастую имеют различия в кариотипе по сравнению с первичными клетками; их можно получить из здоровой ткани или опухоли либо млекопитающих, либо насекомых.

Процесс очистки вакцин, вводимых инъекционно и производимых с использованием непрерывных линий клеток, валидируют на способность удаления ДНК клеток-субстратов до уровня, равного не более 10 нг на одну вакцинную дозу, если другое не будет доказано.

Система банка клеток (система банк культур клеток) [*cell-bank system*]. Производство вакцин с использованием линий диплоидных клеток и перевиваемых линий клеток основано на системе банков клеток. Возраст клеток *in vitro* отсчитывают от главного банка клеток. Каждый рабочий банк клеток готовят из одного или нескольких контейнеров главного банка клеток. Использование, происхождение и распределение контейнеров тщательно документируют.

Среды и вещества животного и человеческого происхождения. Состав питательных сред, применяемых для выделения и последующего культивирования, подробно описывают, а используемые в них вещества животного или человеческого происхождения не должны содержать посторонних агентов (2.6.16) и должны соответствовать общей фармакопейной статье 5.1.7. *Вирусная безопасность*.

При использовании донорского альбумина необходимо обеспечить его соответствие частной статье *Альбумина человека раствор*.

Если используется бычья сыворотка, она должна отвечать требованиям частной статьи *Сыворотка бычья*.

Трипсин, используемый для приготовления культур клеток, контролируют на стерильность и отсутствие микоплазм и вирусов, особенно пестивирусов, цирковирусов и парвовирусов.

Посевная культура клеток (посев клеток) [*cell seed*]. Данные, используемые для оценки пригодности посевной культуры клеток, включают информацию об источнике, истории и характеристике, где это возможно.

Источник посевной культуры клеток. Для линий клеток человека регистрируют следующие данные о доноре: этническое и географическое происхождение, возраст, пол, общее физиологическое состояние, использованная ткань или орган, результаты всех исследований на наличие патогенных микроорганизмов.

Для линий клеток животных регистрируют следующие данные об источнике клеток: вид, линия животных, условия разведения, географическое происхождение, возраст, пол, общее физиологическое состояние, использованная ткань или орган, результаты всех исследований на наличие патогенных микроорганизмов.

Клетки нейронального происхождения, такие нейробластомы и линии клеток P12, могут содержать вещества, в которых концентрируются возбудители губчатой энцефалопатии, и такие клетки не могут быть использованы для производства вакцин.

История посевной культуры клеток. Регистрируют следующую информацию: метод, использованный для выделения первичных клеток, методы культивирования и любые другие процедуры, использованные для создания главного банка клеток, в особенности те, при которых в клеточную культуру могут попасть посторонние агенты.

Полная информация о компонентах питательных сред, использованных в прошлом для культивирования клеток, может быть недоступна, например, об источнике веществ

животного происхождения; если это обосновано и утверждено, уже созданные банки клеток с использованием таких культур могут применяться в производстве вакцин.

Характеристика посевной культуры клеток.

Определяют следующие свойства:

- (1) подлинность клеток (например, изоферменты, серология, последовательность нуклеиновой кислоты);
- (2) характеристики роста клеток и их морфологические свойства (оптическая и электронная микроскопия);
- (3) для линий диплоидных клеток – кариотип;
- (4) для линий диплоидных клеток – продолжительность жизни *in vitro*, выраженная с учетом уровней удвоения популяции.

Стабильность клеток-продуцентов. Должна быть подтверждена соответствующая жизнеспособность линий клеток в предполагаемых условиях хранения. Для каждого препарата, производимого с использованием линий клеток, следует подтвердить возможность постоянного производства на клетках различных уровней пассажа в начале и в конце предполагаемой длительности использования.

Посторонние инфекционные агенты. Линии клеток для производства вакцин не должны содержать посторонних инфекционных возбудителей. Испытания на выявление посторонних агентов проводятся в соответствии с таблицей 5.2.3.-1, используя методы, описанные ниже.

Для клеточных линий, выделенных из насекомых, применяют испытания на определенные вирусы, релевантные видам насекомых, из которых были выделены клетки, и на арбовирусы (артропозные вирусы). Набор испытуемых вирусов выбирают в соответствии с текущим состоянием научных знаний.

Линии клеток, в которых обнаружены ретровирусы, способные к репликации, не применяют для производства вакцин.

Таблица 5.2.3.-1

Испытания линий клеток

Испытание	Посевная культура клеток	Главный банк клеток	Рабочий банк клеток	Клетки на максимальном уровне удвоения популяции или выше, используемые при производстве
1. ПОДЛИННОСТЬ И ЧИСТОТА				
Морфология	+	+	+	+
Подлинность: метод «отпечатка пальцев» нуклеиновой кислоты и соответствующий выбор из следующих методов: биохимический (например, изоферментный анализ), иммунологический (например, гистосовместимость), цитогенетические маркеры				
Кариотип (диплоидные линии клеток)	+	+	+(1)	+(1)
Продолжительность жизни (диплоидные линии клеток)	–	+	+	–
2. ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ				
Заражение бактериями и грибами	–	+	+	–
Микоплазмы	–	+	+	–
Спироплазмы (линий клеток, выделенных из насекомых)	–	+	+	–

Электронная микроскопия (линий клеток, выделенных из насекомых)	–	+ ⁽³⁾	–	+ ⁽³⁾
Испытания на внешние агенты в клеточных культурах	–	–	+	–
Испытание на клеточных культурах	–	–	+	–
Совместное культивирование	–	–	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾
Испытания на животных и яйцах	–	–	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾
Специфические испытания на наличие возможных посторонних агентов в зависимости от происхождения клеток (см. ниже пункт Посторонние инфекционные агенты)	–	–	+ ⁽²⁾	+ ⁽²⁾
Ретровирусы	–	+ ⁽³⁾	–	+ ⁽³⁾
3. КАНЦЕРОГЕННОСТЬ				
Канцерогенность	+ ⁽⁵⁾	–	–	+ ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Диплоидный характер устанавливают для каждого рабочего банка клеток, но с использованием клеток на максимальном уровне удвоения или свыше его, используемом для производства.

⁽²⁾ Испытание проводят для каждого рабочего банка клеток, но с использованием клеток на максимальном уровне удвоения популяции, используемом для производства, или свыше него.

⁽³⁾ Испытание проводят для каждого главного банка клеток, но с использованием клеток на максимальном уровне удвоения популяции, используемом для производства, или свыше него.

⁽⁴⁾ Линии MRC-5, WI-38 и FRhL-2 признаны неканцерогенными и не требуют исследований. Испытания не проводят на колониях клеток, о которых известно или предполагается, что они канцерогенны, например, СНО и ВНК-21.

⁽⁵⁾ Испытание проводят на первичных клетках, но с применением клеток на максимальном уровне удвоения популяции, используемом для производства, или превышающем него.

Канцерогенность. Культура клеток для производства живых вакцин не должна быть канцерогенной на любом уровне удвоения популяции, используемом для производства вакцин. Если для производства других типов вакцин используется канцерогенная линия клеток, при валидации должна быть доказана способность процесса очистки обеспечивать удаление остаточного ДНК клеток-продуцентов до содержания не более 10 нг в одной вакцинной дозе, если не установлено другое, и снижение содержания остаточного белка клеток-продуцентов до приемлемого уровня.

Дальнейшие исследования линий клеток не проводят, если известно об их канцерогенном действии. Если неизвестно, обладает ли линия клеток канцерогенным действием, ее либо считают канцерогенной, либо проводят исследования на наличие канцерогенного действия с использованием методики *in vivo*, описанной ниже, и дополнительно испытание *in vitro*, если необходима дополнительная информация. Испытания проводят на клетках на максимальном уровне удвоения популяции или превышающем его, который будет использоваться при производстве вакцин.

Линии клеток MRC-5, WI-38 и FRhL-2 признаны неканцерогенными, и их дополнительное исследование не требуется.

Характеристика хромосом. Должно быть доказано, что линии диплоидных клеток имеют диплоидный набор хромосом. Если удаление неразрушенных клеток при обработке биомассы после сбора не было валидировано, необходимо провести более детальную характеристику линии диплоидных клеток путем анализа кариотипа. Испытания проводят на образцах четырех пассажей, полученных через равные промежутки в течение жизненного цикла клеток. Для точного подсчета хромосом и частоты гиперплоидии, гипоплоидии, полиплоидии, повреждений и структурных аномалий следует исследовать минимум 200 клеток в метафазе. Линии клеток MRC-5, WI-38 и FRhL-2 признаны диплоидными и охарактеризованы в достаточном объеме; если они не подвергались генетическим модификациям, их дополнительная характеристика не требуется.

Морфология: морфология клеток должна быть адекватно описана и задокументирована.

Подлинность. Для идентификации клеток используют метод «отпечатка пальцев» нуклеиновой кислоты и определяют подходящие из приведенных ниже параметров:

- (1) биохимические характеристики (изоферментный анализ);
- (2) иммунологические характеристики (антигены гистосовместимости);
- (3) цитогенетические маркеры.

Посторонние (контаминирующие) клетки. Метод «отпечатка пальцев» нуклеиновой кислоты используют как для целей идентификации, так и для доказательства отсутствия посторонних клеток.

Загрязнение бактериями и грибами. Главный банк клеток и каждый рабочий банк клеток должны быть стерильны (2.6.1), в испытании используют 10 мл супернатанта культур клеток для каждой питательной среды. Испытанию подвергают 1 % контейнеров, но не менее 2 контейнеров.

Микоплазмы (2.6.7). Главный банк клеток и каждый рабочий банк клеток должны выдерживать испытание на микоплазмы. Испытание проводят на одном или более контейнере.

Спироплазмы (линии клеток, выделенные из насекомых). При проверке валидированным методом, разрешенным компетентным уполномоченным органом, главный банк клеток и каждый рабочий банк клеток, выделенных из насекомых, не должны содержать спироплазм. Испытание проводят на одном или более контейнере.

Электронная микроскопия (линии клеток, выделенные из насекомых). Главный банк клеток исследуют электронной микроскопией на присутствие посторонних агентов. Линии клеток содержат при температуре, обычно используемой при производстве, и отбирают их при достижении или превышении максимального уровня удвоения популяции. Кроме того, линии клеток содержат при температурах выше или ниже той, что используется при производстве, и могут также подвергаться другим видам обработки, например, воздействию со стороны химических стресс-факторов. Наряду с температурами хранения и видами обработки компетентный уполномоченный орган устанавливает количество исследуемых секционированных клеток.

Испытание на наличие посторонних агентов в культурах клеток. Клетки исследуют на наличие гемадсорбирующих вирусов и других посторонних агентов в культурах клеток, приведенных в статье 2.6.16 в разделе «Производственная клеточная культура: контрольные клетки». Если клетки взяты от обезьяны, их также вводят в культуру клеток почки кролика для исследования на наличие вируса герпеса В (*cercopithecid herpesvirus 1*).

Совместное культивирование. Для клеточных линий, выделенных из млекопитающих и птиц, отдельно культивируют интактные и/или разрушенные клетки совместно с другими клеточными системами, включая клетки человека и обезьяны. Для клеточных линий, выделенных из насекомых, инкубируют экстракты разрушенных клеток с другими клеточными системами, включая клетки человека, обезьяны и по крайней мере одну клеточную линию, которая отличается от той, что используется в производстве, допускаются вирусы насекомых и арбовирусы человека (например, ВНК-21). Проводят исследование для обнаружения морфологических изменений. Для выявления гемагглютинирующих вирусов проводят испытания на жидкостях клеточных культур или на клетках – для выявления гемадсорбирующих вирусов. Испытание на гемагглютинирующие вирусы не применяют для арбовирусов, обнаруженных в клетках насекомых. Клетки выдерживают испытание, если не обнаружено доказательства наличия какого-либо постороннего агента.

Ретровирусы. Исследования на наличие ретровирусов проводят с использованием:

(1) количественного определения образования продукта под действием обратной транскриптазы (*PERT*) (2.6.21); проводят на супернатанте из банка клеток, используя клетки на максимальном уровне удвоения, используемом для производства, или выше него;

(2) трансмиссионной электронной микроскопии;

(3) определения инфекционного титра на клетках человека с *PERT* определением (конечной точки) на супернатанте.

Если испытание (1) и/или испытание (2) дают положительную реакцию, то проводят испытание (3);

Так как чувствительность *PERT* метода очень высока, интерпретация положительного сигнала может быть ошибочной, и решение относительно пригодности клеток-продуцентов принимается с учетом всех имеющихся данных.

Испытания на животных. Вводят внутримышечно (или для мышей, питающихся молоком матери, подкожно) в каждой из следующих групп животных 10^7 жизнеспособных клеток, разделенных поровну между животными в каждой группе:

- (1) два помета мышей в возрасте менее 24 ч, общим числом не менее 10 животных;
- (2) десять взрослых мышей.

Следует ввести интрацеребрально каждой из десяти взрослых мышей 10^6 жизнеспособных клеток для обнаружения возможного наличия вируса лимфоцитарного хориоменингита.

За животными наблюдают не менее 4 недель. Обследуют заболевших животных или животных, у которых наблюдаются аномалии, для определения причины заболевания. Клетки выдерживают испытание, если не обнаружено доказательств наличия какого-либо постороннего агента. Испытание считается недействительным, если менее 80 % животных в каждой группе остаются здоровыми и доживают до конца периода наблюдения.

Испытания на куриных эмбрионах. Жизнеспособные клетки в количестве 10^6 на один эмбрион вводят в аллантоисную полость десяти куриных эмбрионов категории *SPF* (5.2.2) 9–11-дневного возраста и в желточный мешок десяти куриных эмбрионов категории *SPF* 5–6-дневного возраста. Эмбрионы инкубируют не менее 5 дней. Аллантоисную жидкость исследуют на наличие гемагглютининов, используя эритроциты млекопитающих и птиц; испытание проводят при температуре (5 ± 3) °C и $(20-25)$ °C, результаты считывают спустя 30–60 мин. Клетки выдерживают испытание, если не обнаружено доказательств наличия какого-либо постороннего агента. Испытание считается недействительным, если менее 80 % эмбрионов остаются здоровыми и доживают до конца периода наблюдения.

Специфические испытания на возможные контаминанты в зависимости от источника происхождения клеток. Испытания на специфические патогены проводят с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот (*NAT, nucleic acid amplification technique*) (2.6.21) с проведением или без проведения предварительной амплификации в клетках. С другой стороны, можно использовать соответствующие серологические методы, например, иммуносорбентный анализ с ферментной меткой, нейтрализация сыворотки и испытания по выработке антител на подходящих рекомендованных животных. Для клеточных линий, выделенных из грызунов, используют либо испытания по выработке антител на мышах, крысах или хомяках, либо методы амплификации нуклеиновых кислот (2.6.21) для обнаружения видоспецифичных вирусов. Испытание должно учитывать происхождение и историю культуры клеточной линии. Испытания разрабатываются для выявления возможных контаминантов, особенно тех, для которых известно, что они инфицируют латентно, например, вакуолизирующий обезьяний вирус (ОВ-40) у макак-резус или *Flock house* вирус в клетках, выделенных из насекомых.

Испытания на канцерогенность *in vivo*. Испытание заключается в сравнительном анализе исследуемой перевивной культуры клеток и соответствующей положительной контрольной культуры (например, культур клеток HeLa или Hep2).

Биологические модели животных, пригодные для этого теста, включают:

- (1) бестимусных мышей (генотип Nu/Nu);
- (2) новорожденных мышей, крыс или хомяков, получающих антитимоцитную сыворотку или иммуноглобулин;
- (3) облученных мышей с удаленной вилочковой железой, получивших костный мозг от здоровых мышей (T^- , B^+).

Вне зависимости от выбранной биологической модели испытуемые и контрольные клетки вводят инъекционно животным, разделенным на отдельные группы по 10 животных в каждой. В обоих случаях прививочный материал из 10^7 клеток в виде взвеси объемом 0,2 мл вводят внутримышечно или подкожно. Новорожденным животным вводят 0,1 мл антитимоцитной сыворотки или иммуноглобулина на 0, 2, 7 и 14 день после рождения. Сильнодействующая сыворотка или иммуноглобулин подавляет иммунные механизмы

растущих животных до уровня, при котором последующее введение 10^7 положительных контрольных клеток регулярно вызывает опухоли и метастазы. Животные с тяжелыми поражениями и симптомами быстро растущих опухолей следует подвергать эвтаназии, не дожидаясь конца испытания, чтобы избежать ненужных страданий.

В конце периода наблюдения всех животных, включая контрольную группу (группы), подвергают эвтаназии и исследуют на наличие макроскопических и микроскопических признаков пролиферации введенных клеток в месте инъекции и в других органах (например, лимфатических узлах, легких, почках и печени).

При использовании любой биологической модели животных наблюдают и пальпируют через регулярные промежутки времени для обнаружения уплотнений в месте инъекции. Любые сформировавшиеся уплотнения измеряют в двух перпендикулярных направлениях, измеренные размеры регистрируют для оценки наличия прогрессивного увеличения уплотнений. Животных, у которых в период наблюдения уплотнения начинают уменьшаться, подвергают эвтаназии до того, как уплотнения перестанут прощупываться, и проводят гистологическое исследование. За животными с прогрессивно растущими уплотнениями наблюдают в течение 1–2 недель. За половиной животных, у которых уплотнения отсутствуют, наблюдают в течение 3 недель, а за второй половиной – в течение 12 недель до того, как их подвергают эвтаназии и гистологическому исследованию. Каждое животное подвергают некропсии, которая включает обследование на предмет макроскопических признаков формирования опухолей в месте инъекции и в других органах, таких как лимфатические узлы, легкие, мозг, селезенка, почки и печень. Все опухолевые образования в месте инъекции подвергают гистологическому анализу. Кроме того, так как некоторые линии клеток могут вызвать метастазы без признаков местного роста опухоли, проводят гистологическое исследование всех обнаруживаемых местных лимфатических узлов и легких животных.

Испытание считается недействительным, если менее чем у девяти из десяти животных, которым были введены положительные базовые клетки, наблюдаются прогрессивно растущие опухоли.

Испытания на канцерогенность *in vitro*. Могут быть использованы следующие тест-системы:

- (1) образование колоний в мягких агаровых гелях;
- (2) продуцирование инвазивного роста клеток после инокуляции в культуры органа;
- (3) исследование трансформации активности с использованием, например, системы 3Т3 для количественного определения активных онкогенов.

01/2013:50208

5.2.8. СНИЖЕНИЕ РИСКА ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГУБЧАТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МЕДИЦИНСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Этот раздел идентичен Рекомендациям по снижению риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных при применении медицинских и ветеринарных лекарственных средств, Версия 3, (ЕМА/410/01 версия 3) [Комитет по патентованным лекарственным средствам (СРМР), Комитет по ветеринарным лекарственным средствам (СВМР), Европейское агентство по оценке лекарственных средств].

Содержание

1. ВВЕДЕНИЕ

1-1. Научная справка

1-2. Соответствие требованиям законодательства

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ СТАТЬИ

3. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

3-1. Научные принципы снижения вероятного риска

3-2. Животные-источники материала

3-2-1. Географическое происхождение

- 3-2-1-1. Материал от крупного рогатого скота
- 3-2-1-2. Овцы и козы (мелкие жвачные животные)
- 3-2-2. Стада крупного рогатого скота (изолированные) с незначительным риском ГЭКРС (*BSE*)
- 3-3. Части тела животных, биологические среды и выделения как исходные материалы
- 3-4. Возраст животных
- 3-5. Производственный процесс
- 4. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ РИСКА МАТЕРИАЛОВ ИЛИ ВЕЩЕСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, ПРОВОДИМАЯ В СООТВЕТСТВИИ С УСТАНОВЛЕННЫМИ ТРЕБОВАНИЯМИ
- 5. ОЦЕНКА ПОЛЬЗА/РИСК
- 6. ПОЛОЖЕНИЯ ПО ОТДЕЛЬНЫМ МАТЕРИАЛАМ
 - 6-1. Коллаген
 - 6-2. Желатин
 - 6-3. Бычья кровь и материалы из бычьей крови
 - 6-4. Материалы из твердого жира
 - 6-5. Животный уголь
 - 6-6. Молоко и материалы из молока
 - 6-7. Материалы из шерсти
 - 6-8. Аминокислоты
 - 6-9. Пептоны

1. ВВЕДЕНИЕ

1-1. НАУЧНАЯ СПРАВКА

Трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ, *Transmissible Spongiform Encephalopathies – TSEs*) являются хроническими нейродегенеративными заболеваниями, характеризующимися накоплением аномальных изоформ клеточного гликопротеина, известного как PrP (или белок-прион). Аномальная изоформа PrP (PrP^{TSE}) отличается от нормальной PrP (PrP^C) высокой устойчивостью к протеазе и денатурации при высокой температуре. PrP^{TSE}, как полагают, является инфекционным агентом, вызывающим развитие ТГЭ.

ТГЭ болезни животных включают:

- губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота (ГЭКРС, *BSE*);
- скрейпи (почесуха) овец и коз;
- хроническое истощение у оленей и лосей;
- трансмиссивную энцефалопатию норок;
- губчатую энцефалопатию кошачьих (особенно у домашних кошек и больших животных семейства кошачьих, содержащихся в неволе);
- экзотическую губчатую энцефалопатию копытных, содержащихся в зоопарках.

Губчатая энцефалопатия у людей включает различные формы болезни Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), Куру, синдром Герстманна-Штройслерг-Шейнкера (ГШШ), фатальная (хроническая) семейная бессонница (ФСБ). Известны случаи развития ятрогенной трансмиссивной губчатой энцефалопатии. Скрейпи овец была случайным образом передана при применении вакцины *Louping III*, полученной из объединенной партии обработанного формальдегидом мозга и селезенки овец, в которую попал материал от овец, страдающих скрейпи. Также скрейпи была передана овцам и козам при применении инактивированной формальдегидом вакцины против инфекционной агалактии, полученной из гомогенатов мозга и молочной железы овец, инфицированных *Mycoplasma agalactiae*. Сообщалось о случаях передачи БКЯ у человека вследствие парентерального введения соматотропина и гонадотропина, полученного из гипофизов человека. Также случаи возникновения БКЯ связывают с использованием загрязненных инструментов при хирургических операциях на головном мозге и при трансплантации твердой оболочки мозга и роговицы человека.

Межвидовое распространение ТГЭ ограничивают многие естественные барьеры, способность передачи от вида происхождения, штаммы прионов, дозы, пути воздействия, а

для некоторых видов, аллели хозяина гена *PRNP*. При соответствующих обстоятельствах эти барьеры могут быть преодолены.

Губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭКРС, *BSE*) была впервые выявлена в Великобритании в 1986 г. Заболеванием было поражено большое количество животных и отдельные стада. Известно, что ГЭКРС (*BSE*) – заболевание, вызванное приемом пищи, содержащей мясо и костную муку, полученную из животных, больных ТГЭ. В других странах также были зарегистрированы случаи ГЭКРС (*BSE*) как у животных, импортированных из Великобритании, так и у местных животных. Есть убедительные доказательства, что вариантная форма БКЯ вызвана возбудителем, вызывающим ГЭКРС (*BSE*) у крупного рогатого скота. Таким образом, необходимо с осторожностью использовать для производства лекарственных средств биологические материалы от видов, поражаемых болезнями ТГЭ, особенно от крупного рогатого скота.

В связи с активными программами надзора две ранее неопознанные формы атипичной ГЭКРС (ГЭКРС-*L*, также названная *BASE*, ГЭКРС-*H*) были обнаружены в редких единичных случаях в Европе, Северной Америке и Японии. Символы «*L*» и «*H*» указывают на низкое и высокое электрофоретическое расположение резистентной к протеазе изоформы PrP^{TSE}. Следует отметить, что атипичные случаи были обнаружены в странах, в которых до сих пор не встречалась классическая ГЭКРС, например, Швеция, или в которых встречалось всего несколько случаев классической ГЭКРС, таких как Канада или США. Атипичный агент ГЭКРС был экспериментально передан трансгенным мышам с человеческим протеином приона и обезьянам *Cynomolgus*.

Скрейпи (почесуха) обнаружена во всем мире и в большинстве европейских стран. Самый высокий уровень заболеваний отмечен на Кипре. Хотя люди в течение 250 лет были подвержены скрейпи, существующей в природе, нет никаких эпидемиологических свидетельств, непосредственно связывающих скрейпи с губчатой энцефалопатией людей. Однако остается теоретический и в настоящее время не поддающийся оценке риск, что некоторые пищевые белковые добавки, зараженные ГЭКРС (*BSE*), возможно, содержатся в корме для овец. Если такой корм вызывает рекуррентную ГЭКРС (*BSE*) у овец, которая может проявляться в виде скрейпи, то это может представлять риск передачи ТГЭ человеку⁽¹⁾. Далее необходимо принять во внимание, что любой возбудитель ГЭКРС (*BSE*), попадающий в маленькую популяцию жвачных животных через контаминированную пищу, вероятно, будет переработан и распространен⁽²⁾.

Существует также интерес в инфицировании клеток возбудителями ТГЭ для разработки методов определения и для решения основных научных вопросов. Было сообщено о некотором успехе при использовании линий как нервных клеток, так и других клеток. Не очень понятны условия, необходимые для инфицирования клетки, а также сложен процесс, который требует комбинации возбудителя и клетки. Должным образом не рассматривается внесение специфических рекомендаций в отношении клеточных субстратов, используемых в производстве веществ, полученных биологическим/биотехнологическим путем. Однако при оценке риска должна быть принята во внимание возможность инфицирования линии клеток возбудителями ТГЭ.

1-2. СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА

[#]Раздел приводится для информации.[#]

Оценка степени риска. Так как использование материалов, полученных из животных, необходимо для производства некоторых лекарственных средств, и полное исключение риска невозможно, меры, принимаемые для управления риском передачи ГЭКРС (*BSE*) животных при применении лекарственных средств, сводятся к минимизации риска, а не его исключению. Следовательно, выполнение требований законодательства должно быть основано на оценке степени риска с учетом всех важных факторов, описанных в этом подразделе (см. далее).

Правовые аспекты. Настоящие Рекомендации имеют обязательный для исполнения в странах Евросоюза юридический статус согласно:

– Приложению I, часть I, модуль 3, раздел 3.2.: *Содержание: общие принципы и требования*, пункт (9) Директивы 2001/83/ЕС Европейского Парламента и Совета от 6 ноября 2001 года в отношении медицинских лекарственных средств (3);

– Приложению I, Издание I, раздел C *Производство и контроль исходных материалов* в Директиве 2001/82/ЕС Европейского Парламента и Совета от 6 ноября 2001 года в отношении ветеринарных лекарственных средств (4).

Согласно требованиям указанных директив заявитель при регистрации ветеринарных и медицинских лекарственных средств должен доказать, что лекарственные средства произведены в соответствии с последней версией данных Рекомендаций, опубликованной в Официальном журнале Европейского Союза. Это обязательство продолжается во весь период действия регистрации лекарственного средства.

По определению, принцип материалов специфического риска, как определено в Постановлении ЕС № 999/2001 Европейского парламента и Совета⁽⁵⁾, не применим к лекарственным средствам. Однако Постановление ЕС № 1774/2002 Европейского парламента и Совета⁽⁶⁾, которое вступило в действие 1 марта 2003 года, установило правила в отношении побочных продуктов животного происхождения, не предназначенных для потребления человеком. Как правило, если иное не подтверждено, все побочные продукты животного происхождения, используемые в качестве исходных материалов в производстве медицинских продуктов, должны относиться к категории «Материалы и эквиваленты категории 3 (т.е. безопасные)», как указано в Постановлении ЕС № 1774/2002. Использование веществ, полученных из тканей с высоким риском наличия инфекционных агентов, должно быть всесторонне обосновано с помощью соответствующей оценки польза/риск (см. далее).

Настоящие рекомендации следует применять совместно с различными нормативными правовыми документами Европейского Союза, включая решения Комиссии, постоянно вводившиеся в действие с 1991 года. Если возможно, ссылки на эти решения приводятся по тексту. Официальные заявления и пояснения, сделанные Комитетом по патентованным лекарственным средствам (CPMP) и Комитетом по ветеринарным лекарственным средствам (CVMP), применимы для выполнения установленных требований, если соответствующий аспект не рассматривается в Рекомендациях.

Общая фармакопейная статья «*Продукты, которые могут быть переносчиками губчатой энцефалопатии животного происхождения*» Фармакопеи ссылается на этот общий раздел, который совпадает с Рекомендациями.

Разъяснения по выполнению Рекомендаций. По мере расширения научных знаний о ТГЭ, в частности патогенеза заболеваний, CHMP и его Рабочей группе по биологическим препаратам в сотрудничестве с CVMP и его Рабочей группой по иммунологическим препаратам может быть поручена в будущем разработка дополнительного руководства в форме официальных заявлений и пояснений для разъяснения требований Рекомендаций. Дополнительное вспомогательное руководство будет издано Комиссией, размещено на вебсайте Европейского Медицинского Агентства (EMA) и будет учитываться при проведении сертификации веществ Европейским Директоратом по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM).

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ СТАТЬИ

ВИДЫ ЖИВОТНЫХ, ПОДВЕРЖЕННЫХ ТГЭ

Крупный рогатый скот, овцы, козы и животные, которые в природе восприимчивы к возбудителям трансмиссивной губчатой энцефалопатии или восприимчивы к инфекции, передающейся оральным путем, за исключением человека⁽⁷⁾ и приматов, определены как «Виды животных, подверженных ТГЭ⁽⁸⁾».

МАТЕРИАЛЫ

Эта статья распространяется на материалы, полученные от «Видов животных, подверженных ТГЭ», которые используются для получения:

- действующих веществ;
- вспомогательных вещества и адьювантов;
- сырья, исходных материалов и реактивов, используемых в производстве (например, бычий сывороточный альбумин; ферменты; питательные среды, включая среды для

создания рабочего банка клеток или новых главных банков клеток для впервые регистрируемых лекарственных средств).

Требования этой статьи также распространяются на материалы, непосредственно контактирующие с лекарственным средством или оборудованием, используемым для производства лекарственного средства, вследствие чего имеется возможность контаминации продукта.

Материалы, используемые при квалификации производственных помещений и оборудования, например, питательная среда, используемая при валидации асептических процессов для имитации процесса розлива, будут соответствовать требованиям данного раздела, если компонент или компоненты питательной среды получены из тканей, инфекционность в которых не была обнаружена (ткани категории IC), риск перекрестной контаминации с потенциально инфекционными тканями (см. раздел 3-3) был учтен и материалы были получены из страны с малым риском возникновения ГЭКРС или контролируемым уровнем ГЭКРС (Категория А и В соответственно, см. параграф 3-2). Такая информация должна быть представлена в регистрационном досье и проверена при стандартной инспекции на соответствие требований Надлежащей производственной практики (GMP).

Другие материалы, такие как чистящие реагенты, умягчители и смазывающие вещества, с которыми контактирует лекарственное средство при стандартном технологическом процессе или на последней стадии, или в первичной упаковке, рассматриваются в соответствии с требованиями данной статьи, если они являются жировыми производными, полученными с использованием точных физико-химических процессов, как указано в разделе 6.

ПОСЕВНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, БАНКИ КЛЕТОК И СТАНДАРТНАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ/ПРОИЗВОДСТВО⁽⁹⁾

В соответствии с установленными требованиями, главные посевные материалы и главные банки клеток, указанные в регистрационных досье, поданных на рассмотрение после 1 июля 2000 г., должны соответствовать данным Рекомендациям. Главные посевные материалы и главные банки клеток для вакцинных антигенов, для биотехнологических лекарственных средств (определенных согласно Приложению к Постановлению Совета (ЕС) № 726/2004 Европейского парламента и Совета⁽¹⁰⁾), а также для других лекарственных средств, в процессе производства которых используются системы посевных материалов и банков клеток, использование которых для получения компонента зарегистрированного лекарственного средства уже было разрешено, будут считаться соответствующими Рекомендациям, даже если они включены в регистрационные досье, поданные к рассмотрению после 1 июля 2000 г.

Для главных банков клеток и главных посевных материалов, созданных до 1 июля 2000 г., но еще не разрешенных в качестве компонентов зарегистрированного лекарственного средства, должны быть представлены данные, подтверждающие соответствие требованиям Рекомендаций. Если на сырье, исходный материал или реактив, использованные при получении этих банков клеток или посевных материалов, нет полного документального досье, заявитель должен представить результаты оценки риска согласно разделу 4 Рекомендаций.

Созданные рабочие посевные материалы или банки клеток, используемые в производстве лекарственных средств, зарегистрированных до 1 июля 2000 г., оценка риска которых была проведена компетентным уполномоченным органом государства-члена Европейского Союза или ЕМА и была сочтена приемлемой, будут также соответствовать установленным требованиям. Однако, если в процессах ферментации/производства или при получении рабочих посевных материалов и рабочих банков клеток используются материалы, полученные из «видов животных, подверженных ТГЭ», то заявитель должен представить доказательства их соответствия требованиям Рекомендаций.

3. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

3-1. НАУЧНЫЕ ПРИНЦИПЫ СНИЖЕНИЯ ВЕРОЯТНОГО РИСКА

Если у производителя есть выбор, то предпочтительно использование материалов, полученных не из «видов животных, подверженных ТГЭ», или синтетического происхождения. Должны быть представлены обоснования использования материалов, полученных из «видов животных, подверженных ТГЭ» вместо материалов из «видов животных, не подверженных ТГЭ» или вместо материалов синтетического происхождения. Если необходимо использование материалов из «видов животных, подверженных ТГЭ», должны быть приняты все необходимые меры по снижению риска передачи ТГЭ.

Готовые диагностические наборы для выявления инфекционных агентов ТГЭ *in vivo* пока еще не доступны. Диагноз ТГЭ основывается на посмертном подтверждении характерных мозговых повреждений с помощью гистопатологических данных и/или обнаружением PrPTSE с помощью Вестерн-блоттинга или иммунологических испытаний. Также для подтверждения наличия инфекционного агента ТГЭ используется введение предполагаемой инфицированной ткани чувствительным к заболеванию лабораторным животным. Однако из-за длительных инкубационных периодов всех агентов ТГЭ результаты испытаний *in vivo* получают только по истечении месяцев или лет.

Для определения PrPTSE в образцах после забоя было разработано несколько иммунохимических испытаний, и некоторые из них сейчас считаются высокочувствительными. Однако их способность определять инфицированных животных зависит от времени отбора образцов по отношению ко времени экспозиции, типа собранных тканей и полученной инфекционной дозы, наряду со временем начала клинического заболевания. Сейчас существует недостаточно информации о влиянии видовой изменчивости на данное определение.

Несмотря на то, что скрининг животных-источников материалов с помощью испытаний *in vitro* может предотвратить использование животных на поздних стадиях инкубационного периода заболевания и предоставить информацию об эпидемиологическом статусе данной страны или региона, ни один из тестов не является пригодным для однозначного подтверждения отрицательного статуса животного.

Снижение риска передачи ТГЭ основано на трех взаимодополняющих параметрах:

- животные – источники материала и их географическое происхождение;
- природа материала животного происхождения, используемого в производстве, и выполнение процедур по предупреждению перекрестной контаминации с материалами с более высоким уровнем риска;
- процесс (процессы) производства, включая наличие системы обеспечения качества, чтобы гарантировать однородность и прослеживаемость продукта.

3-2. ЖИВОТНЫЕ – ИСТОЧНИКИ МАТЕРИАЛА

Исходные материалы, используемые для получения материалов, используемых в производстве лекарственных средств, должны быть получены от животных, годных для использования в пищу человеком и выдержавших до и после забоя проверку в соответствии с требованиями Европейского Союза или сходными (третья страна) условиями, за исключением материалов, полученных из живых животных, которые должны быть признаны здоровыми по результатам клинического обследования.

3-2-1. Географическое происхождение

3-2-1-1. Материал от крупного рогатого скота

Всемирная организация по охране здоровья животных (OIE)⁽¹¹⁾ устанавливает критерии по оценке статуса стран в главе Международного Кодекса Здоровья Животных по губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота. Страны или регионы классифицируются следующим образом:

- А) страны или регионы с незначительным риском возникновения ГЭКРС;
- В) страны или регионы с контролируемым риском возникновения ГЭКРС;
- С) страны или регионы с неопределенным риском возникновения ГЭКРС.

Как оговорено в Постановлении (ЕС) № 999/2001 Европейского Парламента и Совета⁽¹²⁾, классификация стран и регионов по риску возникновения ГЭКРС, основанная на установленных Всемирной организацией по охране здоровья животных (OIE) правилах, официально вступила в силу в Европейском Союзе 1 июля 2007 г. В Решении комиссии

2007/453/ЕС⁽¹³⁾ представлена классификация стран и регионов в зависимости от риска возникновения ГЭКРС.

Ранее Исполнительный Комитет по науке Европейской Комиссии (*Scientific Steering Committee, SSC*)⁽¹⁴⁾ установил временную систему классификации стран согласно их географическому риску появления ГЭКРС (*BSE*) (*Geographical BSE Risk, GBR*)⁽¹⁵⁾.

В целях настоящего раздела должна использоваться классификация ГЭКРС, основанная на правилах Всемирной организации по охране здоровья животных (*OIE*). Если страна, ранее классифицируемая в соответствии с критериями *SSC GBR*, еще не была проклассифицирована по правилам *OIE, GBR* классификация может использоваться до классифицирования Всемирной организацией по охране здоровья животных при условии отсутствия подтверждения значительных изменений в риске возникновения ГЭКРС⁽¹⁶⁾.

По возможности животные должны быть из стран с минимально возможным риском возникновения ГЭКРС (страны с незначительным риском возникновения ГЭКРС (Категория А)), за исключением, когда обосновано использование материала из стран с высоким риском возникновения ГЭКРС. Некоторые материалы, указанные в разделе «6. Положения по отдельным материалам», могут быть из стран с контролируемым риском возникновения ГЭКРС (категория В) и в некоторых случаях из стран с неопределенным риском возникновения ГЭКРС (категория С) при условии, что применяются указанные в соответствующих разделах контроль и требования. Кроме этих исключений, животные не должны быть из стран с неопределенным риском возникновения ГЭКРС (категория С), кроме этого, должны быть предоставлены обоснования использования животных из стран с неопределенным риском возникновения ГЭКРС (категория С).

3-2-1-2. Овцы и козы (мелкие жвачные животные)

О клинических случаях заболевания животных скрейпи в природе сообщалось во многих странах мира. Поскольку ГЭКРС (*BSE*) у овец и коз может быть ошибочно диагностирована как скрейпи, в качестве меры предосторожности при оценке материалов, полученных от мелких жвачных животных, учитывается заболеваемость животных в стране как ГЭКРС (*BSE*), так и скрейпи, а также тип тканей, из которых получены материалы.

Для разработки системы по определению статуса стада мелких жвачных животных в отношении ТГЭ могут быть использованы принципы, установленные в разделе «3-2-2. Стада крупного рогатого скота с незначительным риском ГЭКРС (*BSE*)». Для присвоения стаду овец статуса свободного от ТГЭ стада, из-за возможности появления ГЭКРС (*BSE*) у овец, может быть использован определенный генотип(ы), обуславливающий резистентность к возбудителям ГЭКРС(*BSE*)/скрейпи⁽¹⁷⁾. Однако должна быть принята во внимание возможность, что генотипы, резистентные к скрейпи, могут быть восприимчивы к ГЭКРС (экспериментальное воздействие через ротовую полость) или атипичной скрейпи (случаи в природе). В отношении коз в настоящее время нет достаточных данных о наличии генотипной определенной чувствительности к возбудителям ГЭКРС (*BSE*).

Материал от мелких жвачных животных, как правило, должен быть получен из стран с многолетним статусом отсутствия скрейпи. При происхождении материала из других источников необходимо соответствующее обоснование.

3-2-2. Стада крупного рогатого скота (изолированные) с незначительным риском ГЭКРС (*BSE*)

Самый безопасный источник материала – страны или регионы с незначительной угрозой возникновения ГЭКРС (страны категории А). В других странах могут быть выявлены или уже выявлены случаи заболевания ГЭКРС (*BSE*) в какой-то период времени, в связи с чем *SSC* была разработана практическая концепция «Стада крупного рогатого скота (изолированного) с незначительным риском», одобренная *CHMP* и *CVMP*. Критерии по созданию и поддержанию «стада крупного рогатого скота (изолированного) с незначительным риском ГЭКРС (*BSE*)» изложены в заключении *SSC* от 22–23 июля 1999 года⁽¹⁸⁾.

В настоящее время невозможно измерить степень снижения географического риска ГЭКРС (*BSE*) для животных из стад крупного рогатого скота (изолированных) с незначительным риском ГЭКРС (*BSE*). Однако предполагается, что это снижение достаточно существенное. Следовательно, получение исходных материалов от таких

изолированных стад крупного рогатого скота при оценке риска будет рассматриваться с учетом категории страны по классификации *OIE*.

3-3. ЧАСТИ ТЕЛА ЖИВОТНЫХ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДЫ И ВЫДЕЛЕНИЯ КАК ИСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Различные органы и биологические среды животного, страдающего ГЭКРС (*BSE*), имеют различную степень инфекционной активности. Если используются материалы от видов животных, для которых характерно ТГЭ, приоритет должен быть отдан материалам, относящимся к категории с наименьшим риском. Таблицы, представленные в Приложении к данному разделу⁽¹⁹⁾, резюмируют современные данные о распределении инфекционности и PrP^{TSE} у крупного рогатого скота с ГЭКРС и у овец и коз со скрейпи⁽²⁰⁾.

Информация, приведенная в таблице, получена исключительно при изучении случаев заболевания в природе или экспериментальных моделях при заражении оральным путем первичным возбудителем (у крупного рогатого скота) и не содержит данные от моделей заболевания, в которых используются штаммы ТГЭ, адаптированные к лабораторным животным, так как фенотипы штаммов, подвергнутых пересевам, могут значительно отличаться от имеющихся в природе. Поскольку было доказано, что иммуногистохимическое исследование и/или Вестерн-блоттинг неправильно упакованного белка-хозяина (PrP^{TSE}) является условным маркером инфекционной активности, результаты исследования PrP^{TSE} были представлены вместе с данными биологических исследований. Ткани сгруппированы в три основные категории в отношении инфекционной активности независимо от стадии болезни:

Категория IA	Ткани с высокой инфекционной активностью
	ткани центральной нервной системы (ЦНС), в которых обнаруживаются высокие инфекционные титры на более поздних стадиях ТГЭ, и некоторые ткани, которые анатомически связаны с ЦНС
Категория IB	Ткани с более низкой инфекционной активностью
	периферические ткани, результаты исследования которых подтвердили наличие инфекционной активности и/или PrP ^{TSE} по крайней мере одной из форм ТГЭ
Категория IC	Ткани, в которых не обнаружена инфекционная активность
	ткани, результаты исследования которых на наличие инфекционной активности и/или PrP ^{TSE} были отрицательными

Ткани категории IA и материалы, полученные из них, не должны использоваться в производстве лекарственных средств, за исключением случаев, когда возможность их использования обоснована (см. Раздел 5).

Несмотря на то, что в группу тканей с более низким уровнем риска (ткани категории IB) почти всегда относятся некоторые ткани с более низким уровнем риска (например, кровь), чем другие (например, лимфоретикулярные ткани), данные об уровнях инфекционной активности в этих тканях слишком ограничены, чтобы выделить в этой категории подкатегории с различным уровнем риска. Также очевидно, что отнесение определенной ткани к той или иной категории может зависеть от заболевания или вида животных и подлежит пересмотру по мере появления новых данных.

При оценке риска (см. раздел 4) производители и/или заявители/держатели регистрационных удостоверений должны учитывать классификацию тканей, приведенную в таблицах Приложения к этому общему разделу⁽¹²⁾.

Категории в таблице являются приблизительными, поэтому важно учитывать следующие аспекты.

– В определенных ситуациях может произойти перекрестная контаминация тканей с различной категорией инфекционной активности. На вероятность риска будут влиять условия, при которых ткани были получены, в частности наличие контакта тканей с более низкой инфекционной активностью или тканей, в которых не было обнаружено инфекционной активности (ткани категории IB и IC) с тканями с высокой инфекционной активностью (ткани категории IA). Степень перекрестной контаминации некоторых тканей может быть увеличена, если в процессе забоя зараженных животных используется

оглушение мозга (проникающее или непроникающее) или перерезание спинного мозга и/или головного мозга. Риск перекрестной контаминации будет меньше при сборе биологических жидкостей с минимальным повреждением ткани и удалении клеточных компонентов, при сборе эмбриональной крови без контаминации другими материнскими или эмбриональными тканями, включая плаценту, амниотическую и аллантоисную жидкости. Перекрестную контаминацию определенных тканей с тканью категории IA очень трудно или невозможно предотвратить (например, череп). Это должно быть учтено при оценке риска.

– Для определенных классов веществ используемая техника оглушения/убоя может быть критична для определения потенциального риска⁽²¹⁾ из-за вероятности попадания частиц мозга в периферические органы, в частности, в легкие. Техника оглушения/убоя должна быть описана, так же как и процедуры удаления тканей с высокой инфекционной активностью. Должны быть подробно описаны процедуры сбора тканей/органов животных, которые будут использоваться, и принимаемые меры по предупреждению перекрестной контаминации с материалом более высокого риска.

– На вероятность контаминации тканей и органов возбудителями ГЭКРС (*BSE*), потенциально присутствующими в материале из ЦНС, при использовании техники оглушения, используемого для убоя крупного рогатого скота, влияют следующие факторы:

- степень инфекционной активности ТЭКРС (*BSE*) в мозге умерщвленного животного,
- степень повреждения головного мозга,
- распространение мозговых частиц по телу животного.

Эти факторы следует оценивать вместе с категорией места происхождения животных по классификации *OIE/GBR*, возрастом животных в случае использования крупного рогатого скота и посмертными исследованиями крупного рогатого скота валидированными методиками. Основные принципы, описанные выше, также применимы к овцам и козам.

Риск возникновения перекрестной контаминации будет зависеть от некоторых дополнительных факторов, включая:

- меры, предпринятые для предупреждения контаминации во время сбора тканей (см. выше);
- уровень контаминации (количество контаминированных тканей);
- количество и тип одновременно получаемых материалов.

Производители и заявители/держатели регистрационного удостоверения должны оценивать риск с учетом вероятности перекрестной контаминации.

3-4. ВОЗРАСТ ЖИВОТНЫХ

Поскольку инфекционная активность при ТГЭ у крупного рогатого скота нарастает в инкубационный период, длящийся нескольких лет, рекомендуется использовать в качестве источника материалов молодых животных.

Подтверждено присутствие инфекционного материала больше всего в центральной нервной системе и прилегающих тканях, а также в лимфоретикулярной системе, в зависимости от ТГЭ агента (ГЭКРС у крупного рогатого скота или скрейпи у овец и коз). Точный период действия инфекционности, дата начала инфекции в соответствующих частях тела и тканях не известны в обоих случаях и по сути сложно четко дать определение возрасту, выше которого различные ткани могут быть инфицированы и не должны быть собраны. До сих пор действует главная рекомендация по сбору тканей в самом молодом возрасте. Также очевидно, что возрастной критерий зависит также от географического происхождения. Возраст является более важным критерием для материалов из стран, где риск выше (страны Категории В и С), чем для стран с незначительным риском ГЭКРС (страны Категории А).

3-5. ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ПРОЦЕСС

Оценка общего снижения потенциального риска лекарственных средствах в отношении ТГЭ должна проводится с учетом мер по контролю:

- источника сырья/исходных материалов;

– производственного процесса. Контролируемые источники материалов являются очень важным критерием по обеспечению приемлемой безопасности продукта вследствие имеющихся данных о резистентности возбудителей ТГЭ к большинству процедур инактивации.

Контроль производственного процесса и его серийности (то есть формирование серии, разделение партий, процедуры очистки между производством разных серий) должен осуществляться в рамках соответствующей системы обеспечения качества, например, *ISO 9000*, *HACCP*⁽²²⁾ или *GMP*. Должны выполняться процедуры, обеспечивающие прослеживаемость материалов, проведение внутренних аудитов и аудитов поставщиков сырья/исходных материалов.

Определенные технологические процедуры могут значительно снизить риск контаминации ТГЭ, например, процедуры, используемые при производстве производных жиров (см. раздел 6). Так как такие жесткие процессы химической обработки не могут быть применены ко многим продуктам, более приемлемыми для них могут быть процессы физического удаления материала, богатого прионами, такие как осаждение и фильтрация. Должно быть представлено подробное описание производственного процесса, включая внутрипроизводственный контроль, а также обсуждены технологические стадии, которые могут снизить или исключить риск контаминации ТГЭ. В случае участия в производственном процессе нескольких производственных площадок должны быть четко указаны стадии, выполняемые на каждой площадке. Должны быть описаны все принимаемые меры по обеспечению прослеживаемости каждой производственной серии до исходного материала.

Процесс очистки. Процедуру очистки технологического оборудования может быть трудно валидировать на способность удаления возбудителей ТГЭ. Имеются сообщения о том, что после работы с препаратами с высоким титром возбудителей ТГЭ поддающееся обнаружению количество инфекционных агентов может быть адсорбировано на поверхности нержавеющей стали. Удаление всех адсорбирующихся белков при помощи *1 M раствора натрия гидроксида* или хлорсодержащими дезинфицирующими средствами (например, 20 000 ppm хлора в течение 1 ч) считается приемлемым методом в случаях, когда оборудование (которое не может быть заменено) подвергалось воздействию потенциально контаминированного материала. Более мягкая обработка с ограниченными концентрациями щелочи или стабилизированной хлорной извести при соответствующем смешивании с очищающими средствами и при использовании указанной температуры была проведена для демонстрации подобной эффективности для удаления прионов, как и при использовании классического NaOH или хлорирования. Система, основанная на превращенном в пар перексиде водорода, также является эффективной для инактивации возбудителей ТГЭ. Эти новые способы обработки более совместимы с чувствительными материалами и могут быть пригодны для практического применения⁽²³⁾.

При использовании в производстве продукта материалов с риском ТГЭ для снижения риска перекрестной контаминации между производственными сериями должны выполняться процедуры очистки, включая внутрипроизводственный контроль. Это особенно важно, если обработка материалов различных категорий риска проводится на одной производственной площадке с использованием одного и того же оборудования. Если при производстве продукта используются материалы категории IA, то производство должно осуществляться на оборудовании специального назначения, если иное не подтверждено.

Дальнейшие исследования необходимы для развития и валидации новых методов обеззараживания для уменьшения риска перекрестной контаминации для материалов и устройств, которые не совместимы с рекомендованными ВОЗ методами.

Валидация процедур удаления/инактивации. Валидационное изучение процедур удаления/инактивации ТГЭ достаточно трудно интерпретировать. Необходимо учитывать природу добавляемого к образцам материала и его применимость к обычной ситуации, дизайн исследования (включая уменьшение масштаба технологических процессов) и методики обнаружения возбудителя (количественное определение *in vitro* или *in vivo*). Для выработки рекомендаций по наиболее приемлемому для работ по валидации способу подготовки образцов методом добавок необходимы дальнейшие исследования. Поэтому в

настоящее время проведение работ по валидации не требуется. Однако, если в регистрационном досье имеются утверждения о безопасности продукта в отношении ТГЭ, основанные на способности производственных процессов удалять или инактивировать возбудителей ТГЭ, они должны быть подтверждены соответствующими испытаниями⁽²⁴⁾.

В дополнение к контролю за происхождением материалов производителям рекомендуется продолжать изучение методов удаления и инактивации инфекционных агентов, используемых для идентификации операций/процессов, которые могли бы более эффективно обеспечить удаление или инактивацию возбудителей ТГЭ. В любом случае производственный процесс производства всегда, когда это возможно, должен быть разработан с учетом имеющейся информации о методах, считающихся пригодными для инактивации или удаления возбудителей ТГЭ.

Для определенных типов продуктов (см. раздел «6-3. Бычья кровь и материалы из бычьей крови»), где валидированные методы удаления/инактивации трудно применимы, может быть необходима оценка процесса. Она должна быть основана на исходном материале и любых опубликованных данных о риске ТГЭ.

4. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ РИСКА МАТЕРИАЛОВ ИЛИ ВЕЩЕСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, ПРОВОДИМАЯ В СООТВЕТСТВИИ С УСТАНОВЛЕННЫМИ ТРЕБОВАНИЯМИ

При оценке риска, связанного с ТГЭ, необходимо тщательное рассмотрение всех параметров, описанных в общих чертах в разделе «3-1. Научные принципы снижения вероятного риска». Как было указано во введении данной общей статьи, соответствие установленным требованиям основывается на получении благоприятного результата при оценке риска. Проводимые производителями и/или заявителями или держателями регистрационных удостоверений оценки риска различных материалов или веществ, полученных от «видов животных, подверженных ТГЭ» и используемых при производстве лекарственных средств, должны показать, что все факторы риска ТГЭ были учтены и, при возможности, что риск был минимизирован путем выполнения принципов, описанных в этой общей фармакопейной статье. Сертификаты пригодности по ТГЭ, выданные *EDQM*, могут использоваться заявителями или держателями регистрационных удостоверений в качестве основ оценки риска.

Всесторонняя оценка риска для лекарственного средства, проведенная заявителем или держателем регистрационного удостоверения, должна содержать оценку риска для всех различных материалов, полученных от «видов животных, подверженных ТГЭ», и, где возможно, оценку снижения содержания агентов ТГЭ или их инактивации на технологических стадиях производства действующего вещества и/или лекарственного средства.

Окончательное решение о соответствии установленным требованиям принимает компетентный уполномоченный орган.

Выбор и обоснование порядка контроля определенного материала, полученного из «видов животных, подверженных ТГЭ», осуществляется производителями и/или заявителями или держателями регистрационных удостоверений на медицинские лекарственные средства с учетом последних данных о научном и технологическом прогрессах.

5. ОЦЕНКА СООТНОШЕНИЯ ПОЛЬЗА/РИСК

В дополнение к параметрам, указанным в разделе 3 (которые могут быть описаны в Сертификате пригодности ТГЭ, изданном *EDQM*) и 4, при оценке приемлемости определенного лекарственного средства, содержащего материалы, полученные от «видов животных, подверженных ТГЭ», или на финальных стадиях производства которого используются эти материалы, учитывают следующие факторы:

- путь введения лекарственного средства;
- количество материала животного происхождения, включенного в состав лекарственного средства;
- максимальная терапевтическая доза (суточная доза и продолжительность лечения);
- показания к применению лекарственного средства и его клинический эффект;

– присутствие видового барьера.

Ткани с высокой инфекционной активностью (ткани категории IA) и вещества, полученные из них, не должны использоваться в производстве лекарственных средств, исходных материалов для них и полупродуктов (включая действующие и вспомогательные вещества и реактивы), если иное не разрешено. Должно быть представлено обоснование необходимости использования исключительно данных материалов. В этих исключительных и оправданных обстоятельствах использование тканей с высокой инфекционной активностью в производстве действующих веществ может быть разрешено при предоставлении заявителем положительной оценки соотношения польза/риск, основанной на результате оценки риска в соответствии с разделом 4 и предполагаемых показаниях к применению. Вещества, производимые из материалов категории IA, если их использование обосновано, должны быть получены от животных из стран с незначительным риском ГЭКРС (Категория A).

6. ПОЛОЖЕНИЯ ПО ОТДЕЛЬНЫМ МАТЕРИАЛАМ

Описанные ниже материалы, полученные от «видов животных, подверженных ТГЭ», считаются соответствующими требованиям настоящей общей статьи Фармакопеи в случае их соответствия, по крайней мере, условиям, определенным ниже. Соответствующая информация или сертификат пригодности, выданный *EDQM*, должны быть представлены держателями регистрационных удостоверений или заявителями.

6-1. КОЛЛАГЕН

Коллаген – это фибриллярный белковый компонент соединительной ткани млекопитающих.

С целью подтверждения соответствия вещества требованиям данной общей статьи документация на коллаген должна быть представлена с учетом положений разделов 3–5. Кроме того, должно быть рассмотрено следующее.

– Для коллагена, полученного из костей, применяют требования, установленные для желатина (см. ниже). В процессе производства коллагена предполагается более низкая способность к инактивации, чем в процессе производства желатина. Поэтому источник становится более важным критерием, принимаемым во внимание.

– Коллаген, произведенный из таких тканей, как шкура, кожа, сухожилие и спилок шкур, обычно не обладает существенным риском в отношении ТГЭ, если возможность контаминации потенциально зараженными материалами, например, попадание крови и/или тканей ЦНС, при их заготовке исключена. Таким образом, шкуры являются наиболее безопасным источником материала среди производных коллагена для вживления человеку. Однако перекрестная контаминация с полученными во время убоя материалами мозга, которые могут быть высушены на поверхности шкур, может быть трудно преодолимой. Это другой критерий, который учитывается в процессе оценки безопасности источника материала.

Процесс производства коллагена может иметь некоторые общие стадии с процессом производства желатина, такие как обработка щелочью и натрия сульфатом, кальция гидроксидом и натрия гидроксидом или ферментами. Однако даже эти общие стадии могут различаться в длительности и значениях рН, что может привести к существенным отличиям в их способности к инактивации. Производители должны по крайней мере провести оценку, основанную на сходствах стадий производства коллагена по сравнению с известными стадиями инактивации в процессе производства желатина, для доказательства безопасности продукта. Кроме производства отличия также присутствуют при последнем использовании материала и, следовательно, в их оценке степени риска, в то время как желатин широко используется для перорального приема, многие коллагеновые компрессы представлены в виде хирургических имплантов. Данный аспект также должен быть учтен при конечной оценке степени риска.

6-2. ЖЕЛАТИН

Желатин – это природный растворимый белок, способный или не способный к гелеобразованию, образующийся при частичном гидролизе коллагена, полученного из костей, шкуры и кожи животных.

С целью подтверждения соответствия вещества требованиям данной общей статьи документация на желатин должна быть представлена с учетом положений разделов 3–5. Кроме того, должно быть рассмотрено следующее⁽²⁵⁾.

Используемый исходный материал

Желатин, входящий в состав лекарственных средств, может быть произведен из костей или шкур.

Шкуры как исходный материал. Согласно имеющимся в настоящее время данным шкуры, используемые для производства желатина, представляют собой более безопасный исходный материал, чем кости. При этом должны быть обеспечены условия, предупреждающие во время заготовки перекрестную контаминацию потенциально зараженными материалами.

Кости как исходный материал. При получении желатина из костей качество исходного материала должно быть проверено на дополнительный параметр для подтверждения безопасности конечного продукта. Таким образом, должны быть учтены следующие ниже критерии.

1. Череп и спинной мозг должны быть удалены из собранных костей (сырой/исходный материал) вне зависимости от возраста или страны происхождения крупного рогатого скота.

2. Позвоночник должен быть удален из сырого/исходного материала у крупного рогатого скота старше 30 месяцев из стран с контролируемым или неопределенным риском ГЭКРС (Категории В и С).

3. Желатин для парентерального применения должен быть произведен только из костей из стран с незначительным или контролируемым риском ГЭКРС (Категория А и В соответственно). Желатин для перорального применения должен быть произведен из костей из стран с незначительным, контролируемым или неопределенным риском ГЭКРС (Категории А, В и С соответственно).

4. Желатин должен быть произведен с использованием одного из методов производства, описанных ниже.

Методы производства

Шкуры. При производстве желатина из шкур не требуется особых способов и условий переработки, если выполняются все контрольные операции по предупреждению перекрестной контаминации при заготовке шкуры и в ходе производственного процесса.

Кости. При использовании костей в качестве исходного материала процесс производства будет вторым параметром для подтверждения безопасности желатина.

– Кости для производства желатина должны быть получены из стран с незначительным, контролируемым или неопределенным риском ГЭКРС (Категории А, В и С), в соответствии с условиями, описанными в разделе 6-2 (подраздел «Используемый исходный материал»), используя в процессе производства кислоту, щелочь или нагревание/давление.

– Процесс производства должен учитываться при проведении оценки степени риска, как указано в разделе 4 данной статьи. Как кислотный, так и щелочной методы производства продемонстрировали схожую общую инактивацию/удаление ТГЭ инфекционности в желатине при проведении валидации. Исследования показали, что дополнительная обработка щелочью (рН 13, в течение 2 ч) костей/оссеина повышает способность процесса производства к инактивации/удалению ТГЭ. Другие стадии процесса, такие как фильтрация, ионообменная хроматография и высокотемпературная стерилизация, также могут способствовать безопасности желатина.

– При стандартном щелочном способе производства кости тщательно измельчают, обезжиривают горячей водой и деминерализуют кислотой хлористоводородной разведенной (не менее 4 % и рН < 1,5) в течение по крайней мере 2 дней для получения оссеина. Потом проводится его щелочная обработка насыщенным раствором кальция гидроксида (рН не менее 12,5) в течение по крайней мере 20 дней. Желатин экстрагируют, промывают, фильтруют и концентрируют.

– Для бычьих костей может применяться кислотный способ. При этом обработка насыщенным раствором кальция гидроксида заменяется на предварительную обработку кислотой, при которой оссеин вымачивается при $\text{pH} < 3,5$ как минимум 10 часов.

– «Краткая» термообработка (стерилизация) при $138\text{ }^\circ\text{C}$ как минимум 4 с применяется как при кислотном, так и при щелочном способе производства.

– В процессе нагревания/давления, высушенные обезжиренные сломанные кости автоклавируются с насыщенным паром при давлении более 3 бар и минимальной температуре $133\text{ }^\circ\text{C}$ в течение не менее 20 мин с последующей экстракцией протеина горячей водой.

Конечные стадии одинаковые для щелочного, кислотного способов и нагревания/давления и включают экстракцию желатина, очистку, фильтрацию и концентрацию.

6-3. БЫЧЬЯ КРОВЬ И МАТЕРИАЛЫ ИЗ БЫЧЬЕЙ КРОВИ

Эмбриональная (фетальная) бычья сыворотка широко используется при работе с клеточными культурами. Эмбриональная бычья сыворотка должна быть получена из плодов, извлеченных на скотобойнях у здоровых коров, пригодных для потребления в пищу человеком; матка должна быть полностью удалена; эмбриональная кровь собирается в закрытую систему для сбора крови в специально предназначенном для этого месте или зоне в асептических условиях путем сердечной пункции.

Сыворотку новорожденного теленка получают у телят в возрасте менее 20 дней; сыворотку телят – у животных в возрасте менее 12 месяцев. Донорскую бычью сыворотку получают у животных в возрасте не более 36 месяцев, при этом отрицательный статус стада в отношении ТГЭ должен быть четко определен и зарегистрирован. Во всех случаях для предупреждения перекрестной контаминации тканями с более высоким риском сыворотка должна быть собрана согласно определенным процедурам обученным этим процедурам персоналом.

С целью подтверждения соответствия бычьей крови и производных бычьей крови требованиям данной общей статьи документация на них должна быть представлена с учетом положений разделов 3–5. Кроме того, должно быть рассмотрено следующее.

Прослеживаемость

Должна быть обеспечена прослеживаемость в каждой серии сыворотки или плазмы до скотобойни. У скотобоев должны храниться списки ферм, откуда поступили животные. Если сыворотка получена у живых животных, для каждой серии сыворотки должны вестись записи, обеспечивающие ее прослеживаемость до соответствующей фермы.

Географическое происхождение

Так как уровень инфекционной активности ГЭКРС (*BSE*) тканей крупного рогатого скота более высокий, чем в отношении скрейпи, в качестве меры предосторожности бычья кровь должна быть получена из стран Категории А. Бычья кровь из стран Категории В также применяется, если обеспечивает отсутствие риска перекрестной контаминации крови материалом мозга, полученным при убое животных в возрасте старше 21 месяца⁽²⁶⁾.

Методы оглушения

Если образцы получают от убитых животных, метод оглушения играет важную роль в обеспечении безопасности материала. Было установлено, что оглушение пистолетом с выдвигающимся ударным стержнем с или без прокалывания спинного мозга, так же как пневматическим ударным аппаратом, особенно с введением воздуха, может разрушить мозг и привести к распространению тканей мозга через кровотоки. Непроницающее оглушение более не рассматривается как альтернатива проникающему оглушению, так как происходит контаминация крови материалами мозга⁽²⁷⁾. Незначительный риск может ожидаться при электронаркозе⁽²⁸⁾, однако даже это не обеспечивает полную безопасность, потому что при неудаче животных необходимо оглушить дополнительно. Методы оглушения должны быть обязательно описаны для процесса сбора бычьей крови.

Там, где нельзя избежать риска перекрестной контаминации крови мозгом при рутинном убое скота в странах с контролируемым риском ГЭКРС (Категория В), должны быть приняты меры безопасности, такие как ограничение возраста крупного рогатого скота и/или сокращение возбудителей инфекции во время производства.

Возраст

Для стран с контролируемым риском ГЭКРС (Категория В) для бычьей крови или материалов из бычьей крови должен быть установлен предупредительный возрастной предел равный 21 месяцу, если при производстве существенно не уменьшается количество возбудителей ТГЭ. Возрастной предел в 30 месяцев рассматривается как обязательный для материалов из крови при значительном уменьшении количества возбудителей ТГЭ, как описано выше.

Уменьшение количества возбудителей ТГЭ при производстве

Для производных крови способность процесса производства уменьшать/удалять возбудителей ТГЭ должна быть оценена посредством специальных исследований. Оценка может быть основана на опубликованных или внутрипроизводственных (собственных) данных в том случае, если такие данные важны для специфичного процесса производства. Если не может быть сделано заключение, что способность уменьшения соизмерима, производителям рекомендуется провести продукт-специфичные специальные исследования. Исследования с использованием биохимического анализа может быть достаточно, если существует научное подтверждение корреляции данного анализа с данными по инфекционности. Существует общее руководство по специальным исследованиям по уменьшению количества возбудителей ТГЭ⁽²⁹⁾. Препарат, обогащенный компонентами мозга, является подходящим для специальных исследований риска, обусловленного кровью, контаминированной мозгом.

Таблица 5.2.8.-1

Принцип принятия бычьей крови/сыворотки и их производных

Продукт	Фетальная бычья сыворотка	Донорская сыворотка телят	Бычья сыворотка взрослого донора	Сыворотка телят	Бычья сыворотка/плазма взрослого	Материалы из бычьей сыворотки взрослого	Материалы из бычьей сыворотки	Материалы из бычьей сыворотки взрослого	
Географическое происхождение крупного рогатого скота	Кат. А и В	Кат. А и В	Кат. А и В ¹	Кат. А и В	Кат. А	Кат. В	Кат. А	Кат. В	
Возраст	новорожденный	< 1 года	< 36 месяцев	< 1 года	Нет предела	< 21 месяца ²	Нет предела	< 30 месяцев	
Убой/перекрестная контаминация крови материалом ЦНС	Нет риска перекрестной контаминации			Риск перекрестной контаминации					
Демонстрация уменьшения количества прионов во время производства	Нет			Нет					Да ³

1. Если крупный рогатый скот-источник из стран Категории В, то он должен быть взят из определенного, подтвержденного документально, стада.

2. Если перекрестная контаминация крови материалами ЦНС может быть полностью исключена (например, специальный убой), то возраст может быть увеличен.

3. Доказательства уменьшения количества прионов может быть необязательным, если перекрестная контаминация крови материалами ЦНС может быть полностью исключена (например, специальный убой).

6-4. МАТЕРИАЛЫ ИЗ ТВЕРДОГО ЖИРА

Твердый жир получают из тканей подкожных, брюшных и межмышечных областей и костей. Твердый жир, используемый в качестве исходного материала для изготовления производных жира, должен быть материалом категории 3 или аналогичным материалом согласно Постановлению (ЕС) № 1774/2002 Европейского парламента и Совета от 3

октября 2002 г., устанавливающему правила, касающиеся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для потребления в пищу.

Считается, что материалы из твердого жира, такие как глицерин и жирные кислоты, производимые с использованием жестких процессов, не могут стать источником инфекции; данная тема была предметом специального анализа со стороны *СНМР* и *СВМР*. Поэтому такие материалы, произведенные в условиях по крайней мере столь же жестких, как описано ниже, будут соответствовать требованиям данной общей статьи, независимо от географического происхождения и природы тканей, из которых они получены. Примеры жестких технологических процессов:

– переэтерификация или гидролиз при температуре не ниже 200 °С в течение не менее 20 минут под давлением (производство глицерина, жирных кислот и сложных эфиров жирных кислот);

– омыление с помощью 12 М раствора NaOH (производство глицерина и мыла):

– серийный процесс: при температуре не ниже 95 °С в течение не менее 3 ч;

– непрерывный процесс: при температуре не ниже 140 °С, под давлением в течение не менее 8 мин или эквивалентная обработка;

– перегонка при температуре 200 °С. Материалы из твердого жира, произведенные в соответствии с этими условиями, не будут представлять риск в отношении передачи ТГЭ и, следовательно, будут соответствовать требованиям данной общей статьи. Соответствие материалов из твердого жира, произведенных в других условиях, требованиям данной статьи должно быть доказано.

6-5. ЖИВОТНЫЙ УГОЛЬ

Животный уголь получают путем обугливания тканей животных, таких как кости, при высокой температуре (> 800 °С). Если нет других указаний, исходный материал для производства животного угля должен быть категории 3 или эквивалентным согласно Постановлению (ЕС) № 1774/2002 Европейского парламента и Совета от 3 октября 2002 г., устанавливающему правила, касающиеся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для потребления в пищу. Независимо от географического происхождения и природы ткани, с целью выполнения требований законодательства, животный уголь необходимо оценивать в соответствии с данной общей статьей.

Животный уголь, произведенный согласно этим условиям, маловероятно представляет риск передачи ТГЭ и, соответственно, будет отвечать требованиям данной статьи. Соответствие животного угля, произведенного в других условиях, требованиям данной статьи должно быть подтверждено.

6-6. МОЛОКО И МАТЕРИАЛЫ ИЗ МОЛОКА

Согласно имеющимся научным данным вне зависимости от географического происхождения молоко крупного рогатого скота не представляет риск контаминации ТГЭ⁽³⁰⁾.

Некоторые материалы, включая лактозу, извлекают из молочной сыворотки или отработанной жидкости после коагуляции в процессе производства сыра. При коагуляции может использоваться ренин телянка, экстракт желудка (сычуг) или ренин, полученный у других жвачных животных. *СНМР/СВМР* провели оценку риска лактозы и других материалов из молочной сыворотки, полученной с использованием ренина телянка, и сделали вывод, что риск ТГЭ незначителен, если ренин телянка произведен в соответствии с процессом, описанным в отчете оценки риска⁽³¹⁾. Данное заключение было подтверждено *SSC*⁽³²⁾, который также провел общую оценку риска ренина в отношении ТГЭ⁽³³⁾.

Материалы из молока крупного рогатого скота, произведенные с выполнением описанных ниже условий, не представляют риска передачи ТГЭ и, следовательно, будут соответствовать требованиям данной общей статьи:

– молоко получают от здоровых животных в тех же самых условиях, что и молоко, получаемое для потребления в пищу человеком;

– никакие материалы от других жвачных животных, за исключением ренина телянка, не используются при получении таких материалов (например, панкреатический гидролизат казеина).

Соответствие производных молока, полученных при помощи других процессов, или ренина, полученного от других видов жвачных животных, требованиям данной статьи должно быть подтверждено.

6-7. МАТЕРИАЛЫ ИЗ ШЕРСТИ

Материалы из шерсти и волос жвачных животных, такие как ланолин и спирты шерстяного воска, полученные из волос, будут соответствовать требованиям данной статьи, если шерсть и волосы получают от живых животных.

Материалы из шерсти, полученные от убитых животных, признанных «предназначенными для употребления в пищу» и с использованием технологического процесса с рН, температурой и продолжительностью обработки, соответствующими как минимум одному из указанных ниже условий, не будут представлять риск передачи ТГЭ и, следовательно, соответствуют требованиям данной статьи.

– Обработка при рН > 13 (начальная; концентрации NaOH соответствует по крайней мере 0,1 М концентрации NaOH) при температуре 60 °С в течение не менее 1 ч. Это стандартные условия на стадии промывки шерсти при органическо-щелочной обработке.

– Молекулярная дистилляция при температуре > 220 °С при пониженном давлении.

Соответствие материалов из шерсти, полученных в других условиях, требованиям настоящей общей статьи должно быть подтверждено.

6-8. АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислоты могут быть получены путем гидролиза материалов из различных источников. Если не указано иное, исходный материал для получения аминокислот должен быть категории 3 или эквивалентным, согласно Постановлению (ЕС) № 1774/2002 Европейского парламента и Совета от 3 октября 2002 г., устанавливающему правила, касающиеся субпродуктов животного происхождения, не предназначенных для потребления в пищу.

Аминокислоты маловероятно представляют риск передачи ТГЭ и будут соответствовать требованиям общей статьи, если полученные при выполнении следующих условий:

– аминокислоты, полученные из шкур и кожи с помощью технологического процесса, включающего обработку исходных материалов раствором при рН 1–2, затем при рН > 11, с последующей термообработкой при температуре 140 °С в течение 30 мин при давлении 3 бар;

– полученные аминокислоты или пептиды должны быть отфильтрованы после обработки;

– анализ чистоты проводится с помощью валидированной и чувствительной методики, позволяющей оценить содержание всех остаточных негидролизированных макромолекул в установленных допустимых пределах.

Соответствие аминокислот, полученных в других условиях, требованиям настоящей общей статьи должно быть подтверждено.

6-9. ПЕПТОНЫ

Пептоны – это частично гидролизованные протеины, полученные ферментативным или кислотным расщеплением. Они используются в микробиологической культуральной среде для поддержания питательных нужд микроорганизмов, которые могут быть использованы как семенной фонд, или в промышленной системе ферментации для производства медицинских и ветеринарных лекарственных средств, включая вакцины. Существует значительный интерес в использовании растительного белка в качестве альтернативы животному источнику белка. Однако:

– если в качестве материала – источника протеина используется желатин, ссылка делается на раздел «6-2. Желатин» данной статьи;

– если в качестве материала – источника протеина используется казеин, ссылка делается на раздел «6-6. Молоко и материалы из молока» данной статьи;

– если в качестве материала – источника протеина используются ткани животных, подверженных ТГЭ, ткани должны быть получены от животных, пригодных для

употребления в пищу (смотри раздел «3-2. Животные – источники материала» данной статьи) с максимальным возрастом 30 месяцев для крупнорогатого скота из стран с контролируемым риском ГЭКРС (Категория В); возраст животных не играет роли для животных из стран с незначительным риском ГЭКРС (Категория А).

ПРИМЕЧАНИЕ

(1) В настоящее время это оценивается *EFSA* и *ECDC*. Обновленные данные можно найти по адресу <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionsListLoader?mandate=M-2009-0221>.

(2) В январе 2005 года после подтверждения ГЭКРС у коз во Франции были приняты дополнительные законодательные меры, касающиеся мониторинга и еще большего изучения мелких жвачных животных. Повышенное наблюдение не идентифицировало другие случаи ГЭКРС у овец и коз в ЕС.

(3) OJ L 311, 28.11.2001, p. 67.

(4) OJ L 311, 28.11.2001, p. 1.

(5) OJ L 147, 31.05.2001, p. 1.

(6) OJ L 273, 10.10.2002, p. 1. Постановление (ЕС) 1774/2002 было отменено Постановлением (ЕС) 1069/2009, которое вступило в силу 4 марта 2011 (OJ L 300, 14.11.2009, p. 1).

(7) Руководства и информационные письма были выпущены Комитетом по лекарственным средствам для использования человеком (*CHMP*) и его Рабочей группой по биологическим средствам в отношении лекарственных средств, получаемых с использованием тканей человека, в БКЯ и вариантной БКЯ. Такое руководство может быть найдено на <http://www.emea.europa.eu>.

(8) Свиньи и птицы, представляющие собой наиболее часто используемые виды животных при производстве лекарственных средств, обладают естественной невосприимчивостью к инфекциям, передающимся пероральным путем. Соответственно, положения данного раздела к ним не относятся. Собаки, кролики и рыба не являются видами животных, подверженных ТГЭ.

(9) См. также: Информационное письмо об оценке риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии животных через главные посевные материалы, используемые в производстве вакцин для ветеринарного применения (*EMEA/CVMP/019/01* – февраль 2001 г., принятое Комитетом по лекарственным средствам для ветеринарного применения (*CVMP*) в июле 2001, (OJ с 286, 12.10.2001, p. 12)).

(10) OJ L 136, 30.4.2004, p. 1.

(11) http://oie.int/eng/Status/BSE/en_BSE_free.html.

(12) Постановление (ЕС) № 722/2007 (OJ L.164, 26.6.2007, p. 7).

(13) OJ L 172, 30.6.2007, p. 84.

(14) Исполнительный Комитет по науке, созданный Решением Комиссии 97/404/ЕС (OJ L 169, 27.6.1997, p. 85), должен помогать Комиссии в получении наилучших научных рекомендаций, касающихся здоровья потребителей. С мая 2003 эти функции были переданы Европейскому Агентству по безопасности пищи (*EFSA*): <http://www.efsa.eu.int>.

(15) Классификация географического риска ГЭКРС (*BSE*) (*GBR*) Исполнительного Комитета по науке Европейской комиссии предназначена для оценки уровня вероятности присутствия одного или более животных с клиническими проявлениями или латентным течением ГЭКРС (*BSE*) в данной стране или регионе. Определение этих четырех категорий представлено в приведенной ниже таблице.

Уровень <i>GBR</i>	Присутствие одного или более животных с клиническими проявлениями или латентным течением ГЭКРС (<i>BSE</i>) в данной стране или регионе
I	Очень маловероятно
II	Маловероятно, но не исключено
III	Вероятно, но не подтверждено или подтверждено на низком уровне
IV	Подтверждено на более высоком уровне (≥ 100 случаев / 1 миллион взрослого крупного рогатого скота в год)

Отчеты об оценке стран по классификации *GBR* доступны на вебсайте *SSC* (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html).

(16) Эксперты рассматривают систему классификации *GBR* как стабильную, поэтому она может использоваться далее в течение промежутка времени, пока данная статья не продемонстрирует пригодность к использованию.

(17) Взгляд на Научный Список биологических угроз о «программе выращивания ТГЭ резистентных овец» (http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620775678.htm).

(18) *SSC* научное заключение о «Бычьих стадах с незначительным риском ГЭКРС», принятое на совещании 22–23 июня 1999 года (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out56_en.html).

(19) Таблицы классификации тканей основаны на самых последних указаниях ВОЗ о распространении инфекционности в тканях при трансмиссивной губчатой энцефалопатии (2010) (<http://who.int/bloodproducts.tablestissueinfectivity.pdf>).

(20) Сейчас *EFSA* пересматривается научное заключение о ГЭКРС/ТГЭ инфекционности в тканях мелких жвачных животных (Вопрос № *EFSA-Q-2012-052*). С последними данными можно ознакомиться на сайте <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFronted/questionsListLoader?mandate=M-2010-0041>.

(21) *SSC* заключение о методах оглушения и риске ГЭКРС (*BSE*) (риск попадания частиц мозга в кровь и тушу животных при использовании определенных методов оглушения), принятое на встрече от 10–11 января 2002 года (http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out245_en.pdf). Отчет рабочей группы *EFSA* о риске ГЭКРС от распространения частей мозга в крови и туше. Вопрос № *EFSA-Q-2003-112*, принятый 21 октября 2004 года (http://efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620777397.htm).

(22) *Hazard Analysis And Critical Control Points* (Анализ рисков и критические контрольные точки).

(23) Таблицы классификации тканей основаны на самых последних указаниях ВОЗ о распространении инфекционности в тканях при трансмиссивной губчатой энцефалопатии (2006) (<http://who.int/bloodproducts/tse/WHO%20TSE%20Guidelines%FINAL-22%20juneupdatedNL.pdf>).

(24) Указания об изучении производственного процесса для медицинских лекарственных средств из материалов плазмы с учетом риска вариантной БКЯ *CPMP/BWP/5136/03*.

(25) На основании взгляда на Научный список биологических угроз Европейского управления по безопасности продуктов (*EFSA*) «Количественная оценка риска человеческого ГЭКРС, полученного от желатина, с учетом остаточного риска ГЭКРС». Журнал *EFSA*, 312, (1–28) (http://efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620776107.htm). Требования для источника выбранного материала и метода производства подходят для перорального и парентерального желатина для использования в медицинских лекарственных средствах.

(26) Взгляд на Научный список биологических угроз при оценке возрастного предела у крупно рогатого скота для удаления определенных материалов риска (*OMP, SRM*). Вопрос № *EFSA-Q-2004-146*, принятый 28 апреля 2005 года.

(27) Таблицы классификации тканей основаны на самых последних указаниях ВОЗ о распространении инфекционности в тканях при трансмиссивной губчатой энцефалопатии (2010) (<http://who.int/bloodproducts.tablestissueinfectivity.pdf>).

(28) Отчет рабочей группы *EFSA* о риске ГЭКРС от распространения частей мозга в крови и туше. Вопрос № *EFSA-Q-2003-112*, принятый 21 октября 2004 года (http://efsa.europa.eu/en/sciencebiohaz/biohaz_opinion/opinion_annexes/733.html).

(29) Указания об изучении производственного процесса для медицинских продуктов из материалов плазмы с учетом риска вариантной БКЯ *CPMP/BWP/5136/03*.

(30) Ознакомиться с мнением *EFSA* о молоке и материалах из молока мелких жвачных животных можно в Вопросе № *EFSA-Q-2008-310*, принятом 22 октября 2008 года (<http://efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc849.htm>).

(31) Комитет по лекарственным средствам для использования человеком и его Рабочая группа по биологическим препаратам выполнили оценку риска лактозы, произведенной с использованием ренина телят. Оценка риска включала оценку источника животных и наличие надлежащих процедур обеспечения качества. Качество любых заменителей молока, используемых для кормления животных, из которых получают сычуг, особенно важно. Текст доступен по адресу: <http://ema.europa.eu/pdfs/human/press/pus/057102.pdf>.

(32) Предварительное заключение о безопасности ренина, полученного от телят, для производства лактозы, принятое на собрании *SSC* 4–5 Апреля 2002 года (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out255_en.pdf).

(33) *SSC* высказал мнение о безопасности животного ренина в отношении риска от животных с ТГЭ и ГЭКРС в частности, принятое на собрании 15 мая 2002 года (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out265_en.pdf).

Приложение: основные категории инфекционности тканей

Приведенные ниже таблицы взяты из *Руководства ВОЗ по распределению инфекционности по тканям при трансмиссивных губчатых энцефалопатиях* (2010).

Используемые в Таблицах обозначения:

«+» – наличие инфекционности или PrP^{TSE};

«-» – отсутствие признаков инфекционности или PrP^{TSE};

НП – исследования не проводились;

НИ – исследование не используется;

? – неопределенная интерпретация;

() – ограниченные или предварительные данные;

[] – инфекционность или данные PrP^{TSE}, основанные исключительно на испытаниях на трансгенных (*Tg*) мышах, экспрессирующих PrP-кодирующий ген или PrP^{TSE} методы амплификации.

Категория IA: ткани с высокой инфекционностью

Ткани	Крупный рогатый скот ГЭКРС (<i>BSE</i>)		Овцы и козы скрейпи		Лоси и олени <i>CWD</i>	
	Инфекционность ¹	PrP ^{TSE}	Инфекционность ¹	PrP ^{TSE}	Инфекционность ¹	PrP ^{TSE}
Мозг	+	+	+	+	+	+
Спинальный мозг	+	+	+	+	НП	+
Сетчатка, зрительный нерв	+	НП	НП	+	НП	+
Зрительный нерв ²	+	НП	НП	+	НП	+
Спинномозговой ганглий	+	+	+	+	НП	+
Ганглий тройничного нерва	+	+	НП	+	НП	-
Гипофиз ³	-	НП	+	+	НП	+
Твердая мозговая оболочка	НП	НП	НП	НП	НП	НП

Категория IB: ткани более низкой инфекционности

Ткани	Крупный рогатый скот ГЭКРС (<i>BSE</i>)		Овцы и козы скрейпи		Лоси и олени <i>CWD</i>	
	Инфекционность ¹	PrP ^{TSE}	Инфекционность ¹	PrP ^{TSE}	Инфекционность ¹	PrP ^{TSE}
Периферическая нервная система						
Периферические нервы	[+]	+	+	+	НП	+
Вегетативный ганглий ⁴	НП	+	НП	+	НП	+
Лимфоретикулярные ткани						
Селезенка	-	-	+	+	НП	+
Лимфатические узлы	-	-	+	+	НП	+
Миндалевидная железа	+	-	+	+	НП	+

Мигательная перепонка	+	–	[+]	+	НП	+
Тимус	–	НП	+	+	НП	–
Пищеварительный тракт						
Пищевод	–	НП	[+]	+	НП	+
Преджелудок ⁶ (только у жвачных животных)	–	НП	[+]	+	НП	+
Желудок/сычуг	–	НП	[+]	+	НП	+
Двенадцатиперстная кишка	–	–	[+]	+	НП	+
Тощая кишка ⁷	–	+	[+]	+	НП	НП
Подвздошная кишка ⁷	+	+	+	+	НП	+
Аппендикс	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ
Толстая кишка/слепая кишка ⁷	–	–	+	+	НП	+
Прямая кишка	НП	НП	НП	+	НП	+
Репродуктивные ткани						
Плацента ⁸	–	НП	+	+	НП	–
Яичник ³	–	НП	–	–	НП	–
Матка ³	–	НП	–	–	НП	–
Другие ткани						
Молочная железа/вымя ⁹	–	НП	–	+	НП	НП
Кожа ^{3, 10}	–	НП	–	+	[+]	[+]
Жировые ткани	–	НП	НП	НП	[+]	НП
Сердце/перикардий	–	НП	–	НП	НП	+
Легкие	–	НП	–	–	НП	+
Печень ³	–	НП	+	–	НП	–
Почки ^{3, 11}	–	–	[+]	+	НП	+
Надпочечник	[+]	+	+	–	НП	+
Поджелудочная железа ³	–	НП	+	НП	НП	+
Костный мозг ¹²	[+]	НП	+	НП	НП	–
Скелетная мышца ¹³	[+]	НП	[+]	+	[+]	–
Язык ¹⁴	–	НП	[+]	+	НП	–
Кровеносные сосуды	–	НП	НП	+	НП	–
Слизистая носоглотки ¹⁵	–	НП	+	+	НП	+
Слюнная железа	–	НП	+	НП	–	–
Роговица ¹⁶	НП	НП	НП	НП	НП	НП
Жидкости тела, секрета и экскреция						
Цереброспинальная жидкость	–	НП	+	–	НП	НП
Кровь ¹⁷	–	?	+	?	+	?
Слюна	НП	НП	–	НП	+	[–]
Молоко ¹⁸	–	–	+	[+]	НП	НП
Моча ¹⁹	–	НП	–	–	–[+]	[+]
Фекалии ¹⁹	–	НП	–	НП	–[+]	НП

Категория IC: Ткани без детектируемой инфекционности

Ткани	Крупный рогатый скот ГЭКРС (BSE)		Овцы и козы скрейпи		Лоси и олени CWD	
	Инфекционность ¹	PgP ^{TSE}	Инфекционность ¹	PgP ^{TSE}	Инфекционность ¹	PgP ^{TSE}
Репродуктивные ткани						
Яички	–	НП	–	–	НП	–
Предстательная железа/Эпидидимис/Семенные пузырьки	–	НП	–	–	НП	–
Сперма	–	НП	–	–	НП	НП
Плацента и амниотическая жидкость	–	НП	НП	НП	НП	НП
Плод (зародыш) ²⁰	–	НП	–	–	НП	(–)
Эмбрион ²⁰	–	НП	?	НП	НП	НП
Скелетно-мышечные ткани						
Кость	–	НП	НП	НП	НП	НП
Сухожилие	–	НП	НП	НП	НП	НП
Другие ткани						
Десенные ткани	НП	НП	НП	НП	НП	НП

Пульпа зуба	НП	НП	НП	НП	НП	НП
Трахея	–	НП	НП	НП	НП	–
Щитовидная железа	НП	НП	–	НП	НП	–
Биологические жидкости, секреты и выделения						
Молозиво ²¹	(–)	–	(?)	НП	НП	НП
Пуповинная кровь ²¹	–	НП	НП	НП	НП	НП
Пот	НП	НП	НП	НП	НП	НП
Слезы	НП	НП	НП	НП	НП	НП
Носовая слизь	НП	НП	НП	НП	НП	НП
Желчь	НП	НП	НП	НП	НП	НП

1. Исследования инфекционности тканей человека проводилось или на приматах, или на мышах (или на тех и других), исследования инфекционности тканей крупного рогатого скота проводились или на крупном рогатом скоте, или на мышах (или на тех и других); большинство количественных исследований тканей овец и/или коз проводилось только на мышах. В отношении овец и коз не все результаты сопоставимы для обоих видов, например, две козы (но не овцы) заразились ГЭКРС естественным путем [Eurosurveillance, 2005, Jeffrey et al., 2006]. Подобным образом большинство результатов, описанных для CWD, были получены при исследованиях на оленях, и данные могут отличаться от таковых для лосей и других плотнорогих.

2. На экспериментальных образцах ТГЭ было продемонстрировано, что зрительный нерв является путем к нейровторжению и содержит высокие титры инфекционности.

3. Публикации о каких-либо экспериментальных данных о наличии инфекционности в гипофизе или твердой мозговой оболочке человека со всеми формами человеческого ТГЭ отсутствуют, но отмечены многочисленные случаи передачи трансмиссивной инфекции сотням людей при использовании участков твердой трупной мозговой оболочки и соматотропина, полученного из трупного материала гипофиза человека, поэтому данный материал должен быть включен в категорию тканей с высоким риском заражения. PrP^{TSE} было выявлено иммуноблоттингом в твердой оболочке мозга пациента с вариантной БКЯ, который умер в США после необычно длинного инкубационного периода (см. так же таблицу IV для других положительных тканей: кожа, почки, печень, поджелудочная железа, яичники и матка) [Notari et al., 2010]. Также должны быть отмечены ранее проведенные в Великобритании исследования многочисленных случаев, которые выявили отрицательные ткани [Ironsides et al. 2002, Head et al. 2004].

4. У крупного рогатого скота PrP^{TSE} ограничено дистальным отделом подвздошной кишки, но иммуногистохимический анализ тканей из одиночного случая с ГЭКРС в Японии показал (хотя и сомнительно) вовлечение межмышечного сплетения через маленькую и большую кишки [Kimura and Haritani, 2008].

5. У вариантной БКЯ PrP^{TSE} ограничен связанной с кишечником лимфоидной и нервной тканями (слизистая оболочка, мышцы и серозная оболочка отрицательны).

6. Преджелудок жвачных животных (ретикулум, рубец и книжка) широко используется, как и сам желудок (сычуг). Сычуг крупного рогатого скота (и иногда овцы) является также источником реннина.

7. Когда большая пероральная доза ГЭКРС используется для экспериментального инфицирования крупного рогатого скота, инфекционность была выявлена в тонкой кишке и в месте соединения подвздошной и слепой кишок трансгенных мышей, экспрессирующих PrP [правило Dr. M. Groschup]. PrP^{TSE} было выявлено в низких концентрациях в лимфоидной ткани подвздошной кишки [Terry et al., 2003] и было выявлено даже в более низких количествах в лимфоидной ткани тонкой кишки крупного рогатого скота, также инфицированного пероральным путем [EFSA, 2009].

8. Не было подтверждено ни одного случая передачи спорадического инфекционного БКЯ через плаценту человека, поэтому рассматривается как невозможное.

9. PrP^{TSE} было выявлено у инфицированных скреппи овец с хроническим маститом, но не у инфицированных овец без мастита [Ligios et al., 2005].

10. В ходе исследования у перорально инфицированных скреппи хомяков было выявлено, что скопление PrP^{TSE} в коже находилось внутри маленьких нервных волокон. Также сообщается, что поверхностная кожа «бархат» оленьего рога CWD-инфицированных оленей содержит PrP^{TSE} и инфекционность [Angers et al., 2009].

11. Выявленное иммуноцитохимически PrP^{TSE} в почечной лоханке инфицированных скреппи овец [Siso et al., 2006] и в лимфоидных фолликулах внутри связывающей ткани соседствующей с почечной лоханкой у CWD-инфицированных олень-мулов [Fox et al., 2006].

12. Единичный положительный костный мозг в многочисленных попытках передачи от крупного рогатого скота, перорально зараженного ГЭКРС-инфицированным мозгом [Wells et al., 1999, 2005, Sohn et al., 2009].

13. Мышечные гомогенаты не передают болезнь от приматов человеку с помощью спорадического БКЯ или от крупнорогатого скота крупнорогатому скоту с ГЭКРС. Однако внутрицеребральное введение гомогената *semitendinosus* мышцы (включая нервные и лимфотические компоненты) от единичной коровы с клиническим ГЭКРС передало заболевание трансгенетическим мышам, которые экспрессируют PrP с частотой, показывающей степень присутствия инфекционности [Buschmann and Groschup, 2005]. Также недавно опубликованные и неопубликованные исследования продемонстрировали присутствие PrP^{TSE} в скелетной мускулатуре подопытных грызунов со скреппи и вариантной БКЯ [Beekes et al., 2005], в экспериментальных и природных инфекциях скреппи у овец и коз [Andreoletti et al., 2004], у овец, перорально зараженных ГЭКРС [Andreoletti, неопубликованные данные], и у людей со спорадической, ятрогенной и вариантной формами БКЯ [Glatzel et al., 2003, Kovacs et al., 2004, Pedel et al., 2006]. Исследования мышц

трансгенных мышей, экспрессирующих PrP оленеобразных, документально подтвердили инфекционность у CWD-инфицированных олень-мулов [Angers et al., 2006], и в скором времени исследования позволят определить, связаны ли с инфекционностью выявленные PrP^{TSE} в других формах ТГЭ.

14. У крупного рогатого скота результат определения инфекционности в языке был отрицательным, но присутствие инфекционности в небной миндалине подняло вопрос о возможной инфекционности в ткани язычной миндалины в основании языка, которая могла быть не удалена при убое [Wells et al., 2005, EFSA, 2008]. У 7 из 10 естественно инфицированных скреппи овец животных было выявлено PrP^{TSE} в языке [Casalone et al., 2005, Corona et al., 2006].

15. Ограниченная главным образом областями, вовлеченными в рецепторы обоняния.

16. Поскольку только один случай ятрогенной БКЯ был обоснованно приписан трансплантации роговицы среди сотен тысяч прооперированных (еще один случай рассматривается как вероятный, и еще один только возможен), роговица отнесена к категории тканей более низкого риска; исследование других тканей передней камеры глаза (хрусталик, внутриглазная жидкость, радужная оболочка, конъюнктив) дали отрицательный результат в обоих случаях передачи вариантного БКЯ и других заболеваний ТГЭ человека, и эпидемиологические данные об их связи с ятрогенным путем передачи отсутствуют.

17. Огромное количество данных об инфекционности крови у подопытных грызунов с ТГЭ было увеличено с помощью недавних исследований, подтвердивших документально инфекционность в крови естественно инфицированных скреппи овец и овец, которым перелили кровь от ГЭКРС-инфицированного крупного рогатого скота [Houston et al., 2008], естественно инфицированных CWD оленей [Mathiason et al., 2006] и (при эпидемиологических исследованиях) фракции красных кровяных клеток (которая включает огромное количество плазмы и лейкоцитов) от четырех доноров в пре-клинической фазе вариантной БКЯ [пересмотрено в Brown, 2006, Hewitt et al., 2006]. Введение плазменного фактора VIII также влечет за собой субклинический случай вариантной БКЯ у пациента с гемофилией [Peden et al., 2010]. Было продемонстрировано, что заболевание не передается с помощью крови человека с любой формой «классической» ТГЭ [Dorsey et al., 2009] или крови крупного рогатого скота с ГЭКРС (включая кровь эмбрионов телят). Некоторые лаборатории, которые используют новые высокочувствительные методы для определения PrP^{TSE}, предоставили отчет об успешных результатах в различных человеческих и животных ТГЭ. Однако у некоторых возникли трудности в получении воспроизводимых результатов в плазме, и до сих пор неизвестно, предоставляют ли положительные результаты возможность передачи заболевания как из-за наличия ложно положительных, так и из-за «правдивых» положительных результатов, которые возникают из-за слабо передающихся концентраций PrP^{TSE}. Вследствие данных положений (и фактически до сих пор недоступны данные о слепых тестах образцов от естественно инфицированных людей или животных) экспертная группа считает, что еще очень рано делать вывод о достоверности данных исследований, чтобы с достаточной уверенностью сказать о положительном или отрицательном заключении.

18. Данные об отсутствии инфекционности в молоке от ГЭКРС-инфицированных коров включают длительные эпидемиологические наблюдения, не выявившие передачу заболевания телятам через молоко; клинические наблюдения за более чем 100 телятами, вскармливавшимися инфицированными коровами без симптомов ГЭКРС (BSE); данные экспериментальных исследований об отсутствии передачи заболевания мышам через молоко инфицированных коров, выращенных до возраста, равного минимальному инкубационному периоду, при интрацеребральном или пероральном введении [Middleton and Barlow, 1993, Taylor et al., 1995]. Также PrP^{TSE} не было выявлено в молоке крупного рогатого скота, вынашивающего ГЭКРС после экспериментального перорального введения [SEAC, 2005]. Однако низкий уровень (от мкг/л до нг/л) нормального PrP был определен в молоке как у животных, так и у человека [Franschini et al., 2006]. PrP^{TSE} был выявлен в молочных железах инфицированных скреппи овец с хроническим маститом [Ligos et al., 2005], и совсем недавно было сообщено, что молоко (в некоторых случаях содержит молозиво) от инфицированных скреппи овец передает заболевание здоровым животным [Konold et al., 2008, Lacroux et al., 2008].

19. Смешанный инокулят мочи и фекалий от естественно инфицированных CWD оленей не передает заболевание в течение 18-месячного наблюдения после введения его здоровым оленям с гетерозиготным (96G/S) PRNP генотипом [Mathiason et al., 2006]. Однако последние биопробы трансгенных мышей передали болезнь как при помощи мочи [Haley et al., 2009], так и при помощи фекалий [Tamguney et al., 2009]. Кроме того, мыши с лимфотическим нефритом, которые были экспериментально инфицированы скреппи, избавились и от PrP^{TSE}, и от инфекционности в моче при биоанализе в трансгенных мышцах [Seeger et al., 2005]. Очень низкие уровни инфекционности были выявлены в моче (и гистологически нормальных почках) хомяков, экспериментально инфицированных скреппи [Gregori and Rohwer, 2007, Gonzalez-Romero et al., 2008]. В заключение, в экспериментальной модели с зараженными скреппи хомяками пероральное введение вылилось в инфекционные фекалии при биоанализе в трансгенных мышцах, экспрессирующих PrP [Safar et al., 2008].

20. Эмбрионы крупного рогатого скота с ГЭКРС (BSE) не вызвали заболевание у мышей, однако исследования инфекционности тканей эмбрионов телят ГЭКРС сделаны не были, кроме крови (отрицательная биопроба мышцы) [Fraser and Foster 1994]. Телята, родившиеся от коров, которым вводили эмбрионы с ГЭКРС (BSE), выжили в течение периода наблюдений до семи лет, и исследование головного мозга здоровых коров и их телят не выявило наличие губчатой энцефалопатии или PrP^{TSE} [Wrathall et al., 2002].

21. Единичные сообщения о передаче спорадической инфекционности БКЯ через человеческую пуповинную кровь и молозиво так и не были подтверждены и считаются недостоверными. Биопроба от коров с ГЭКРС у трансгенных мышей, экспрессирующих бычий PrP, дает отрицательный результат

5.3. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ И ТЕСТОВ

1. ВВЕДЕНИЕ

Настоящая часть является руководством для планирования испытаний и тестов биологическими методами, описанными в настоящей Фармакопее, и последующей обработки их результатов. Она предназначена для специалистов, не обладающих специальным образованием и не работающих в области статистики, в том случае, если они несут ответственность за проведение количественного анализа или интерпретацию результатов этих анализов, как правило, без помощи и советов специалистов в области статистики. Приведенные в данной главе методы расчета не являются обязательными при выполнении количественных определений биологическими методами, предусмотренными Фармакопеей. Допускается использование альтернативных методов при условии, что они могут быть согласованы компетентным органом и имеются соответствующие данные, подтверждающие пригодность методики при ее валидации. Существует широкий спектр программного обеспечения, которое может быть полезно в зависимости от средств, доступных аналитику, от его знаний и опыта.

Следует обращаться за помощью к профессионалам в ситуациях, когда:

- требуется детальная проработка плана и методов анализа, подходящих для научного исследования или разработки нового лекарственного средства;

- нельзя придерживаться ограничений, накладываемых данной главой на план количественного определения, например, необходимость корректировки планов количественного определения может быть вызвана специфическими лабораторными условиями или невозможностью применения равных количеств равномерно распределенных доз;

- требуется анализ для расширенных нелинейных графиков зависимости «доза-эффект», например, при проведении количественных иммунологических определений. Основные положения анализа расширенных кривых зависимости «доза-эффект» с помощью одной из распространенных методик, тем не менее, включены в раздел 3.4, а простейший пример представлен в разделе 5.4.

1.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ТОЧНОСТЬ

Биологические методы анализа применяют для количественного определения таких субстанций и препаратов, биологическая активность которых не может быть корректно оценена при помощи химических или физических методов анализа. Везде, где это возможно, в основу количественных определений положен принцип сравнения со стандартным препаратом для того, чтобы определить, какое количество анализируемой субстанции вызовет такой же биологический эффект, как определенное количество (*Единица действия*) стандартного препарата. Существенным условием проведения таких биологических количественных определений является то, что анализ стандартного препарата и исследуемой субстанции должен быть выполнен в одно и то же время и при идентичных условиях.

Для некоторых количественных определений (например, определения титра вируса) активность испытуемого образца не выражается относительно стандарта. Такой тип количественного определения рассмотрен в разделе 4.5.

Любая оценка активности, полученная в ходе биологического количественного определения, включает случайную погрешность, обусловленную свойственной биологическим реакциям изменчивостью, и, если это возможно, следует провести вычисление погрешности результатов каждого количественного определения даже в случае использования официальной методики определения. В этой связи ниже приведены методы планирования количественных определений и вычисления их погрешностей. Каждый раз перед выбором того или иного статистического метода следует провести предварительное

исследование с определенным числом повторений, чтобы убедиться в применимости этого метода.

Доверительный интервал активности приводят для указания точности, с которой была установлена эта активность при количественном определении. Он рассчитывается исходя из плана эксперимента и объема выборки. При количественных определениях биологическими методами обычно выбирается 95 % доверительный интервал. Для обеспечения справедливости утверждения о том, что действительное значение активности находится в данном интервале с вероятностью 95 %, расчет границ доверительного интервала проводится методами математической статистики. Является ли эта точность приемлемой для Фармакопей, зависит от требований, установленных в частной статье на конкретный препарат.

Термины «среднее значение» и «стандартное отклонение» используются в данном разделе в соответствии с их определением в большинстве руководств по биометрии.

Термины «заявленная активность» или «активность, указанная в маркировке», «установленная (аттестованная) активность», «предполагаемая активность», «отношение активностей» и «рассчитанная активность» используются в данном разделе для обозначения следующих понятий:

– «заявленная активность» или «активность, указанная в маркировке»: для готового препарата – номинальное значение, установленное на основании известной активности исходного (нерасфасованного) материала; для исходного (нерасфасованного) материала – активность, установленная производителем;

– «установленная (аттестованная) активность» – активность стандартного препарата;

– «предполагаемая активность» – временно установленная активность испытуемого препарата, на основании которой рассчитываются дозы, которые были бы эквивалентны дозам используемого стандартного препарата;

– «отношение активностей» для испытуемого препарата – отношение равноактивных доз стандартного препарата и испытуемого препарата в условиях количественного определения;

– «рассчитанная активность» – активность, вычисленная на основании данных количественного анализа.

В разделе 9 (словарь символов) приведены наиболее важные используемые в данной главе символы. Если в тексте используется символ, не приведенный в этом разделе, или символ используется в другом значении, то его определение приводится в соответствующей части текста.

2. РАНДОМИЗАЦИЯ И НЕЗАВИСИМОСТЬ ОТДЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Порядок введения препаратов, различных воздействий на экспериментальные объекты (животные, пробирки и т.д.) должен быть осуществлен определенным строго случайным образом. Любой другой выбор экспериментальных условий, который преднамеренно не учитывается в плане эксперимента, также должен быть выполнен случайным образом. Например, выбор размещения боксов в лаборатории и порядок введения препаратов. В частности, группа животных, получающих одинаковую дозу какого-нибудь препарата, не должна одновременно подвергаться исследованию (в то же самое время или в том же самом месте) до тех пор, пока не будет весомых доказательств того, что источник вариации (например, между временем или между положениями) является незначительным. Рандомизация может быть осуществлена с использованием компьютера при помощи встроенного генератора случайных чисел. Каждый раз после запуска программы аналитик должен убедиться, что генерируется новая последовательность случайных чисел.

Препараты, назначаемые каждому экспериментальному объекту, должны быть настолько независимы, насколько это возможно. В пределах каждой экспериментальной группы назначенные разведения должны быть не только разведениями одной и той же дозы, но и должны быть приготовлены индивидуально. Без выполнения данного условия вариабельность, свойственная препарату, не будет полностью представлена в дисперсии ошибки эксперимента. В результате будет недооценена остаточная дисперсия, что может привести к:

1) необоснованному ужесточению критерия при дисперсионном анализе (см. разделы 3.2.3 и 3.2.4);

2) недооценке истинных доверительных интервалов при испытании, которые, как показано в разделе 3.2.5, рассчитаны исходя из оценки s^2 (ошибка среднеквадратической разности или дисперсия остаточной погрешности).

3. ИСПЫТАНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ЭФФЕКТАХ

3.1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

3.1.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Количественные определения биологической активности, включенные в Фармакопею, основаны на «принципе разведения». Это означает, что анализируемый испытуемый препарат предположительно содержит то же самое активное вещество, что и стандартный препарат, но отличается от последнего соотношением активного и неактивного компонентов. В этом случае испытуемый препарат можно теоретически получить из стандартного путем его разведения неактивными компонентами. Для того, чтобы проверить, подчиняется ли какой-либо конкретный тест количественного определения «принципу разведения», необходимо сравнить зависимость «доза-эффект» стандартного и испытуемого препаратов. Если эти зависимости различаются статистически значимо, то теоретическая модель «принципа разведения» не является достоверной. Статистически значимые различия в зависимостях «доза-эффект» для стандартного и испытуемого препаратов позволяют предположить, что один из препаратов, кроме активного компонента, содержит другие компоненты, которые обладают активностью или влияют на измеряемые результаты.

Для того, чтобы в теоретической модели достигнуть хорошо выраженного эффекта разведения, следует преобразовать зависимость «доза-эффект» в линейную функцию в наибольшем возможном диапазоне доз. В качестве модели для рассматриваемых количественных определений биологической активности интерес представляют две модели: модель параллельных линий и модель угловых коэффициентов.

Применение той или иной модели зависит от выполнения следующих условий:

1) различные воздействия на экспериментальные объекты были выполнены случайным образом;

2) результаты (эффект) каждого воздействия подчиняются закону нормального распределения;

3) стандартные отклонения эффектов в каждой исследуемой группе как для стандартного, так и для испытуемого препаратов статистически достоверно не отличаются друг от друга.

При разработке методики количественного определения аналитик должен убедиться, что полученные данные от различных количественных определений удовлетворяют этим теоретическим условиям.

– Условие 1 может быть выполнено при помощи использования раздела 2.

– Условие 2 является предположением, которое на практике почти всегда выполняется. Незначительные отклонения от этого предположения в основном не вносят серьезных ошибок в анализ, поскольку исследование включает несколько повторений. В случае сомнения может быть выполнена проверка на наличие отклонений от нормального распределения (например, при помощи критерия Шапиро-Уилка (*Shapiro-Wilk*)¹).

¹ *Wilk, M. B. and Shapiro, S. S. (1968). The joint assessment of normality of several independent samples, Technometrics 10, 825–839.*

– Для проверки выполнения Условия 3 могут быть использованы тесты проверки однородности дисперсий (например, критерий Бартлетта² (*Bartlett*), критерий Кохрена³ (*Cochran*)). Для этих целей также может быть использовано графическое представление результатов анализа (см. примеры в разделе 5).

² *Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests, Proc. Roy. Soc. London, Series A 160, 280–282.*

Если условия 2 и/или 3 не выполняются, то преобразование результатов может привести к улучшению выполнения этих условий. Примерами таких преобразований являются логарифмическое ($\ln y$), квадратичное (\sqrt{y} , y^2).

– Логарифмическое преобразование значений y в $\ln y$, может выполняться, если однородность дисперсий неудовлетворительна. Оно также может улучшить нормальность распределения, если оно смещено вправо.

– Преобразование y в \sqrt{y} можно использовать в случае, если результаты подчиняются распределению Пуассона, то есть если они получены путем подсчета числа событий.

– Преобразование y в y^2 может быть использовано, если, например, доза в большей мере пропорциональна площади ингибирования зоны роста микроорганизмов, чем измеренному диаметру этой зоны роста.

Для некоторых тестов количественного определения, которые зависят от количественных реакций, например, иммунологический анализ или *in vitro* методы количественного определения с использованием клеточных банков, используется большое число доз. Эти дозы вызывают эффекты, которые полностью охватывают возможный диапазон ответов/реакций и образуют расширенную нелинейную кривую зависимости «доза-эффект». Такие кривые типичны для всех количественных определений биологическими методами, но для многих испытаний использование большого числа доз не отвечает критериям биоэтики (например, определения *in vivo*) или непрактично, и цели такого количественного определения могут быть достигнуты на ограниченном числе доз. Поэтому допускается ограничение количества тестируемых доз до такой части диапазона кривой «доза-эффект», которая была бы линейна после соответствующего преобразования, чтобы можно было применять методы, описанные в разделах 3.2 и 3.3. Однако в некоторых случаях может быть необходим анализ всей расширенной кривой «доза-эффект». Краткое изложение одной из моделей, которая могла бы быть применена для такого анализа, представлено в разделе 3.4, а простой пример описан в разделе 5.4.

Существует другая категория тестов, когда при анализе результат не может быть количественно измерен для каждого экспериментального объекта, а определяется как часть выборки, у которой получен ответ на воздействие. Эта категория рассмотрена в разделе 4.

3.1.2. ПОВСЕДНЕВНЫЕ (РУТИННЫЕ) КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

При рутинном проведении количественного определения практически отсутствует возможность систематически контролировать выполнение условий 1–3, так как ограниченное число измерений в каждом анализе может отрицательно влиять на чувствительность статистических тестов. Однако специалистами по статистическому анализу было доказано, что при симметричных сбалансированных испытаниях небольшие отклонения от однородности дисперсий и нормальности распределения не оказывают существенного влияния на результаты количественного определения. Вопрос о применимости статистической модели следует ставить под сомнение только в том случае, если ряд полученных результатов испытаний имеет сомнительную достоверность. При этом может возникнуть необходимость выполнить новую серию предварительных испытаний, как описано в разделе 3.1.1.

В зависимости от применяемой статистической модели следует контролировать выполнение двух дополнительных условий.

– Для модели параллельных линий:

4А) отношение между логарифмом дозы и регистрируемым результатом может быть представлено в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных доз;

5А) при анализе прямая линия для любого испытуемого препарата параллельна соответствующей прямой линии для стандартного препарата.

– Для модели угловых коэффициентов:

4В) во всем диапазоне исследованных доз отношение между дозой и полученным эффектом для каждого препарата может быть представлено в виде прямой линии;

5B) при анализе для любого испытуемого препарата прямая линия пересекает ось y (при дозе, равной нулю) в той же точке, что и прямая линия для стандартного препарата (другими словами, при анализе графики результирующей функции эффектов всех испытуемых препаратов должны пересекаться с графиками результирующей функции эффектов стандартного препарата в одной и той же точке).

Условия 4A и 4B могут быть подтверждены при количественных определениях, в которых использовано как минимум по три разведения для каждого протестированного препарата. Использование результатов количественного определения, полученных при одном или двух разведениях, может быть обосновано лишь в том случае, если накопленный опыт свидетельствует, что условия линейности, параллельности или совпадение точек пересечения всегда выполняются.

После получения результатов количественного определения и перед вычислением относительной активности каждого препарата выполняется дисперсионный анализ с целью проверки выполнения условий 4A и 5A (или 4B и 5B). Для этого общую дисперсию представляют в виде определенного числа сумм дисперсий, соответствующих каждому выполняемому условию. Оставшаяся дисперсия представляет собой неисключенную (остаточную) погрешность определения. Для нее при помощи расчета F -отношений можно оценить отсутствие или наличие значимых источников вариации.

После валидации методики анализа активность каждого испытуемого препарата по отношению к стандартному может быть рассчитана и выражена как отношение активностей или преобразована в определенные единицы активности, например, в Международные Единицы. Также для каждого ряда данных анализа могут быть установлены доверительные интервалы.

В разделе 3.2 рассматриваются методики количественных определений, основанные на использовании модели параллельных линий, а в разделе 3.3 – основанные на использовании модели угловых коэффициентов.

Если хотя бы одно из перечисленных пяти условий (1, 2, 3, 4A, 5A или 1, 2, 3, 4B, 5B) не выполняется, применение приведенных в данной статье методов вычисления не может быть обосновано и следует провести специальный анализ результатов количественного определения.

Аналитик не должен применять другой метод преобразования до тех пор, пока не убедится, что невыполнение условий является не случайным, а обусловлено систематическим изменением условий испытания. В этом случае, прежде чем принять новое преобразование для постоянных (рутинных) количественных определений, следует повторить исследования, описанные в разделе 3.1.1.

Высокое число недостоверных результатов анализа, возникающих вследствие непараллельности или нелинейности, при выполнении постоянных (рутинных) количественных определений в результате сравнения со стандартным материалом чаще всего свидетельствует о неправильном планировании эксперимента и недостаточном числе повторений. Обычно это обусловлено недостаточно полной идентификацией всех источников вариации, воздействующих на количественное определение, что в результате может привести к заниженной оценке остаточной погрешности и, соответственно, к увеличению значения F -отношений.

В рамках однократного количественного определения не всегда можно принять во внимание все возможные источники вариации (например, внутрилабораторная вариация в серии «изо-дня-в-день»). В этом случае доверительные интервалы повторных результатов количественных определений одного и того же препарата могут не совпадать, и следует соблюдать осторожность при оценке отдельных доверительных интервалов. Для получения более надежной оценки доверительного интервала необходимо выполнить несколько независимых количественных определений, объединить полученные результаты и получить одну оценку активности и доверительный интервал (см. раздел 6).

Для контроля качества постоянных (рутинных) количественных определений рекомендуется заносить в контрольные статистические карты результаты оценки угловых коэффициентов и оценки остаточной погрешности.

Довольно высокая неисключенная (остаточная) погрешность может свидетельствовать об определенной технической проблеме. Эти случаи должны

расследоваться и, при выявлении ошибок в ходе выполнения количественного определения, испытание следует повторить. Необычно высокая остаточная погрешность также может указывать на наличие случайного выброса или неправильного учета результата. Эффект, достоверность которого ставится под сомнение из-за неправильного выполнения количественного определения, следует исключить. Обоснованным также можно считать исключение из общей оценки аномального эффекта после завершения количественного определения, если удастся проследить причину отклонения и убедиться, что она обусловлена нарушениями в ходе количественного определения. Произвольное отбрасывание или сохранение очевидных недостоверных результатов может оказаться серьезным источником погрешности измерения. В целом не рекомендуется отбрасывать результаты лишь на основании статистической значимости исследования на наличие выбросов.

Время от времени может возникать довольно низкая остаточная погрешность, что приводит к превышению F -отношениями критических значений. В этом случае может быть оправданной замена остаточной погрешности отдельного количественного определения на среднюю остаточную погрешность, полученную на основании архивных данных, зафиксированных в контрольных статистических картах.

ВЫЧИСЛЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Согласно общим принципам надлежащего планирования эксперимента на план анализа обычно накладываются следующие три ограничения (они обладают преимуществами как в простоте вычислений, так и в обеспечении их точности):

а) число разведений должно быть одинаковым для каждого из испытываемых препаратов;

б) при использовании модели параллельных линий отношение двух последовательных доз должно быть всегда постоянным для всех введений, проводимых в рамках испытания; при использовании модели угловых коэффициентов должна быть постоянной разница (интервал) между двумя последовательными дозами;

с) число испытываемых объектов должно быть одинаковым во всех исследованиях.

Если используемый план удовлетворяет этим условиям, то вычисления упрощаются. Формулы вычислений приведены в разделах 3.2 и 3.3. Рекомендуется использовать программное обеспечение, разработанное специально для этих целей. Существует ряд статистических программ, при помощи которых можно легко обрабатывать планы количественных определений, приведенные в частных статьях. Не все программы могут использовать одни и те же формулы и алгоритмы, но они все должны приводить к одинаковым результатам.

Планы количественных определений, не отвечающие вышеуказанным требованиям, могут быть также допустимы и корректны. Однако необходимые для таких вычислений формулы слишком сложны и поэтому в данной части не приводятся. Краткое описание методов расчета приводится в Разделе 7.1. Эти методы могут также использоваться для ограниченных планов, в этом случае они эквивалентны упрощенным формулам.

Формулы для ограниченных планов, приведенные в данной статье, могут быть использованы, например, для создания специальных программ с использованием электронных таблиц. Для лучшего понимания статистики и проверки правильности результатов таких программ могут быть использованы примеры, приведенные в Разделе 5.

3.2. МОДЕЛЬ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ЛИНИЙ

3.2.1. ВВЕДЕНИЕ

На рисунке 3.2.1.-I показана модель параллельных линий. Логарифмы доз откладывают по оси абсцисс (x) таким образом, чтобы их значения возрастали слева направо. Наблюдаемые эффекты откладывают по оси ординат (y). Отдельные значения эффектов для каждого из исследований показаны в виде черных точек. Две линии представляют собой рассчитанную зависимость « $\ln(\text{доза})$ -эффект» для стандартного и испытываемого препаратов.

Примечание: в данной части во всех случаях используется натуральный логарифм (\ln или \log_e). Везде, где используется термин «антилогарифм», подразумевается значение e^x . Тем не менее также можно пользоваться логарифмом Бриггса или десятичным логарифмом (\lg или \log_{10}). В этом случае соответствующий «антилогарифм» равен 10^x .

Для удовлетворительного количественного определения предполагаемая активность испытуемого препарата должна быть близка к действительной активности. Исходя из предполагаемой активности испытуемого препарата и аттестованной активности стандартного препарата готовятся разведения с одинаковой (по возможности) активностью. То есть соответствующие дозы стандартного и испытуемого препаратов должны вызывать одинаковый эффект. Если нет информации о предполагаемой активности, выполняют серию предварительных определений в широком диапазоне доз для установления области, в которой эта зависимость является линейной.

Чем точнее определена принятая предполагаемая активность испытуемого препарата к аттестованной активности стандартного препарата, тем ближе одна к одной будут эти линии, поскольку они должны давать одинаковые эффекты при одинаковых дозах. Горизонтальное расстояние между линиями представят собой «истинное» значение активности испытуемого препарата по отношению к его предполагаемой активности. Чем больше расстояние между линиями, тем менее точен прогноз в отношении предполагаемой активности испытуемого препарата. Если линия, соответствующая испытуемому препарату, смещена вправо от линии, соответствующей стандартному препарату, то оценка предполагаемой активности была завышена и при расчетах рассчитанная активность будет ниже предполагаемой. Аналогично, если линия, соответствующая испытуемому препарату, расположена слева от линии, соответствующей стандартному препарату, то предполагаемая активность была занижена и при определении рассчитанная активность будет выше предполагаемой.

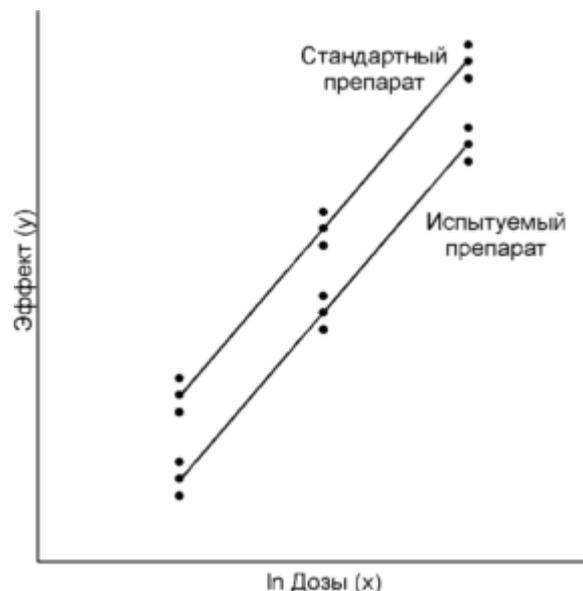


Рисунок 3.2.1.-I. Модель параллельных линий в случае анализа (3 + 3)

3.2.2. ПЛАН МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для оптимизации точности плана анализа будет полезным соблюдение следующих требований:

- 1) отношение между угловым коэффициентом и остаточной погрешностью должно быть как можно большим;
- 2) диапазон доз должен быть максимально широким;
- 3) линии должны располагаться как можно ближе друг к другу, т.е. предполагаемая активность должна с хорошей точностью давать оценку «истинной» активности.

Распределение экспериментальных объектов (животные, пробирки и т.д.) для различных исследований может быть осуществлено разными способами.

3.2.2.1. Дизайн (схема) полной рандомизации

Если вся совокупность экспериментальных объектов считается достаточно однородной и нет никаких оснований полагать, что разброс результатов будет меньшим внутри определенным образом сформированных подгрупп, распределение объектов в разные группы выполняется случайным образом.

Если объекты, распределенные в таких подгруппах, как положение в пространстве или дата исследования, распределены более однородно, чем вся совокупность в целом, точность количественного определения может быть повышена путем введения в план исследований одного или нескольких ограничений. Тщательно продуманное распределение объектов с использованием этих ограничений позволяет исключить незначимые источники вариации.

3.2.2.2. Дизайн (схема) рандомизированных блоков

В основе этой схемы лежит возможность выделить идентифицируемый источник вариации (например, различная чувствительность у нескольких приплодов экспериментальных животных или различие между чашками Петри в случае микробиологического определения активности методом диффузии в агаре). В соответствии с данной схемой каждое исследование должно быть повторено одинаковое число раз в каждом из блоков (приплод или чашка Петри). Данная схема применима только тогда, когда блок достаточно большой для осуществления всех видов воздействий. Пример использования такой схемы приведен в Разделе 5.1.3. Также допускается использовать схемы рандомизированных блоков с повторностями. В пределах каждого блока воздействия должны распределяться случайным образом.

В Разделе 8.5 приведен алгоритм, при помощи которого можно получить случайные перестановки.

3.2.2.3. Дизайн (схема) латинского квадрата

Данная схема применяется, когда на наблюдаемый результат воздействует два различных источника вариации, каждый из которых может характеризоваться k различными уровнями или позициями. Например, в случае количественного определения антибиотиков с использованием планшетов исследования могут быть организованы на большом планшете в виде матрицы $k \times k$, причем каждое воздействие встречается по одному разу в каждом столбце и в каждой строке. Схема применяется в случае, когда число строк, столбцов и число исследований одинаково. Результаты записываются в виде квадрата, называемого латинским. Вариации, обусловленные различием в результатах между k строками и k столбцами, могут быть сгруппированы, что позволит уменьшить погрешность. Пример использования схемы латинского квадрата приведен в Разделе 5.1.2. В Разделе 8.6 дан алгоритм для построения латинских квадратов. В некоторых случаях могут быть полезны более сложные построения, где в рамках латинского квадрата повторяется одно или больше воздействий (введений препарата). Упрощенные формулы, приведенные в настоящем разделе, не подходят для таких планов, поэтому требуется совет специалиста.

3.2.2.4. Перекрестный дизайн (схема)

Данную схему полезно применять, когда эксперимент может быть разделен на блоки, но к каждому блоку возможно применить только два вида воздействия. Например, таким блоком может быть один экспериментальный объект, который может быть протестирован дважды. Данная схема предназначена для повышения точности путем исключения различий результатов между объектами за счет их взаимной компенсации при двух экспериментах с общим уровнем эффекта. Если исследуются две дозы испытуемого и стандартного препаратов, такую схему называют двойной перекрестной схемой.

Эксперимент разбивают на две стадии, разделенные достаточным промежутком времени. Объекты подразделяют на четыре группы, и на первой стадии эксперимента в каждой группе выполняется одно из четырех воздействий. Объекты, которые на первой стадии получали один препарат, на второй стадии получают второй препарат. Объекты, которые на первой стадии получали меньшие дозы, на второй стадии получают большие. Распределение доз приведено в Таблице 3.2.2.-I. Пример использования схемы показан в Разделе 5.1.5.

Распределение доз при использовании перекрестной схемы

Группа единиц	Период I	Период II
1	S_1	T_2
2	S_2	T_1
3	T_1	S_2
4	T_2	S_1

3.2.3. ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ (ANOVA)

В данном разделе приведены формулы, которые необходимы при выполнении дисперсионного анализа. В Разделе 5.1 рассмотрены конкретные примеры, позволяющие понять назначение этих формул. Если необходимо, можно также обратиться к списку терминов и условных обозначений (Раздел 9).

Приведенные формулы пригодны для симметричных количественных определений, в которых один или более испытуемых препаратов (T , U и др.) сравниваются со стандартным препаратом (S). Следует подчеркнуть, что формулы могут быть использованы только в том случае, если дозы отличаются одна от другой в одинаковое число раз, если каждый из препаратов исследуется в одинаковом числе доз и если каждая доза применяется одинаковое число раз. Если эти условия не выполняются, данные формулы не должны применяться для анализа.

За исключением некоторых уточнений остаточной погрешности, основной статистический анализ данных количественного определения одинаков для схем полной рандомизации, рандомизированных блоков и латинских квадратов. Формулы для перекрестной схемы исследования значительно отличаются и приведены в примере 5.1.5.

Исходя из рассмотренных в Разделе 3.1 пунктов и преобразовав, если это необходимо, эффекты, для каждой группы и для каждой дозы препарата следует вычислить среднее значение, как описано в таблице 3.2.3.-I. Также следует вычислить линейные контрасты, связанные с наклоном прямых « $\ln(\text{доза})$ -эффект». В таблице 3.2.3.-II приведены три дополнительные формулы, которые необходимы для проведения дисперсионного анализа.

Общая вариация результатов, вызванная различными последовательностями введения препаратов, подразделяется далее, как описано в таблице 3.2.3.-III; сумму квадратов при этом рассчитывают с использованием данных из таблиц 3.2.3.-I и 3.2.3.-II. Сумма квадратов, обусловленная нелинейностью, может быть рассчитана только в том случае, если при количественном определении использовались по крайней мере по три дозы каждого из препаратов.

Остаточная погрешность (вариация) количественного определения рассчитывается путем вычитания вариаций, обусловленных схемой эксперимента, из общей вариации для эффекта (таблица 3.2.3.-IV). В этой таблице \bar{y} – среднее значение всех результатов, полученных при количественном определении. Следует отметить, что для латинского квадрата число результатов в повторностях (n) равно числу строк, столбцов и видов воздействий (последовательности доз) (dh).

Дисперсионный анализ завершают следующим образом. Находят дисперсию (средний квадрат отклонения) путем деления каждой суммы квадратов на соответствующее число степеней свободы. Далее оценивают статистическую значимость отношения дисперсии для каждой переменной к остаточной погрешности (s^2) (так называемое F -отношение), для этого можно использовать таблицу 8.1 или соответствующую функцию компьютерного программного обеспечения.

Таблица 3.2.3.-I

Формулы для количественных определений с d дозами каждого из препаратов, при использовании модели параллельных линий

	Стандартный препарат (S)	1-й испытуемый препарат (T)	2-й испытуемый препарат (U и т.д.)
--	------------------------------	---------------------------------	---------------------------------------

Средний эффект от минимальной дозы	S_1	T_1	U_1
Средний эффект от второй дозы	S_2	T_2	U_2
...
Средний эффект от максимальной дозы	S_d	T_d	U_d
Суммарный эффект препарата	$P_S = S_1 + S_2 + \dots + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + \dots + T_d$	$P_U = \dots \text{ и т.д.}$
Линейный контраст	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + \dots + dS_d - \frac{1}{2}(d+1)$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + \dots + dT_d - \frac{1}{2}(d+1)$	$L_U = \dots \text{ и т.д.}$

Таблица 3.2.3.-II

Дополнительные формулы для дисперсионного анализа

$H_p = \frac{n}{d}$	$H_L = \frac{12n}{d^3 - d}$	$K = \frac{n(P_S + P_T + \dots)^2}{hd}$
---------------------	-----------------------------	---

Таблица 3.2.3.-III

Формулы для расчета суммы квадратов и числа степеней свободы

Источник вариации (размаха)	Степени свободы (f)	Сумма квадратов
Препараты	$h - 1$	$SS_{prep} = H_p(P_S^2 + P_T^2 + \dots) - K$
Линейная регрессия	1	$SS_{reg} = \frac{1}{h} H_L(L_S^2 + L_T^2 + \dots)^2$
Непараллельность	$h - 1$	$SS_{par} = H_L(L_S^2 + L_T^2 + \dots) - SS_{reg}$
Нелинейность(*)	$h(d - 2)$	$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - SS_{par}$
Группы (последовательность доз)	$hd - 1$	$SS_{treat} = n(S_1^2 + \dots + S_d^2 + T_1^2 + \dots + T_d^2 + \dots) - K$

(*) Не рассчитывается для двухдозовых количественных определений.

Таблица 3.2.3.-IV

Оценка остаточной погрешности (вариации)

Источник вариаций	Степени свободы	Сумма квадратов
Блоки (строки)(*)	$n - 1$	$SS_{block} = hd(R_1^2 + \dots + R_n^2) - K$
Столбцы(**)	$n - 1$	$SS_{col} = hd(C_1^2 + \dots + C_n^2) - K$
Остаточная вариация(***)	$hd(n - 1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
	$(hd - 1)(n - 1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block}$
	$(hd - 2)(n - 1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col}$
Общая вариация	$nhd - 1$	$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2$

Для схемы латинского квадрата эти формулы применимы только в случае, если $n = hd$

(*) Не рассчитывается для схемы полной рандомизации.

(**) Рассчитывается только для схемы латинских квадратов.

(***) Зависит от схемы рандомизации.

3.2.4. ПРОВЕРКА ДОСТОВЕРНОСТИ

Результаты количественного определения считаются «статистически обоснованными», если при дисперсионном анализе выполняются следующие условия:

1) проведенные вычисления свидетельствуют о значимости линейной регрессии, т.е. рассчитанная вероятность меньше 0,05; если это условие не выполняется, вычислить доверительный интервал с вероятностью 95 % не представляется возможным;

2) проведенные вычисления свидетельствуют, что непараллельность незначима, т.е. рассчитанная вероятность не меньше 0,05; это означает, что выполняется условие 5А (Раздел 3.1);

3) проведенные вычисления свидетельствуют, что нелинейность незначима, т.е. рассчитанная вероятность не меньше 0,05; это означает, что выполняется условие 4А (Раздел 3.1).

Значимое отклонение от параллельности при многократных количественных определениях может быть обусловлено тем, что угловой коэффициент кривой зависимости « $\ln(\text{доза})$ -эффект» для одного из препаратов, включенных в исследование, отличается от аналогичного значения для других препаратов. В этом случае допускается не признавать несостоятельность всего анализа, а исключить результаты, имеющие отношение к этому препарату, и повторить статистический анализ заново.

После того, как установлена статистическая достоверность, могут быть рассчитаны оценки активности препаратов и границы доверительных интервалов при помощи приведенных в следующем разделе методов.

3.2.5. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ

Если обозначить через I натуральный логарифм отношения между ближайшими значениями доз любого из препаратов, то общий для всех прямых угловой коэффициент (b) в случае количественного определения, которое включает d доз для каждого препарата, вычисляется по формуле:

$$b = \frac{H_L(L_S + L_T + \dots)}{Inh} \quad (3.2.5.-1)$$

Логарифм отношения активности испытуемого препарата, например T , вычисляют по формуле:

$$M_T' = \frac{P_T - P_S}{db} \quad (3.2.5.-2)$$

Рассчитанная активность представляет собой оценку «истинной активности» каждого из испытуемых препаратов. Границы доверительного интервала могут быть рассчитаны как антилогарифм выражения:

$$CM_T' \pm \sqrt{(C-1)(CM_T'^2 + 2V)} \quad (3.2.5.-3)$$

$$\text{где: } C = \frac{SS_{\text{рег}}}{SS_{\text{рег}} - s^2 t^2}, \text{ а } V = \frac{SS_{\text{рег}}}{b^2 dn}.$$

Значение t может быть найдено из таблицы 8.2 при $p = 0,05$ и числе степеней свободы, равном числу степеней свободы остаточной погрешности. Оценка активности (R_T) и соответствующий доверительный интервал вычисляют путем умножения результатов на

величину A_T после антилогарифмирования. Если выяснится, что активности исходных растворов, приготовленных исходя из ожидаемой предполагаемой и установленной (аттестованной) активностей, не равны между собой, следует ввести поправочный коэффициент (см. примеры 5.1.2 и 5.1.3).

3.2.6. ПРОПУЩЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ (ЗНАЧЕНИЯ)

В случае сбалансированного количественного определения существует вероятность случайной потери одного или нескольких результатов, абсолютно не связанной с процедурой количественного определения, например, вследствие смерти животного. Если будет доказано, что смерть животного никоим образом не связана с составом введенного препарата, возможность выполнения точных расчетов остается, но формулы значительно усложняются и могут быть представлены только в рамках общих линейных моделей (см. Раздел 7.1). Тем не менее существует приблизительный метод, в котором простота сбалансированного плана сохраняется путем замены потерянного результата рассчитанным значением. Потерю информации учитывают следующим образом: число степеней свободы для общей суммы квадратов и для остаточной погрешности уменьшают на число потерянных результатов, а для вычисления отсутствующих значений используют одну из приведенных ниже формул. Следует иметь в виду, что этот метод является приблизительным, и предпочтение следует отдавать точным расчетам.

Если потеряно более одного результата, могут быть использованы эти же формулы. В этом случае для всех потерянных значений, кроме одного, проводят грубые приближенные оценки. Для этого значения вычисляют при помощи соответствующей формулы с учетом всех имеющихся данных, включая сделанные первичные предположения. Это рассчитанное значение включают в общий массив данных и аналогичным образом проводят вычисление значений для первой из грубых оценок. После вычисления всех пропущенных значений повторяют весь цикл сначала, используя более точные приближения или рассчитанные значения для каждого результата, для которого применялась формула. Такой цикл вычислений повторяют до тех пор, пока два последовательных цикла не дадут те же самые значения. Обычно сходимость достигается очень быстро.

При условии, что число замененных результатов невелико по отношению к общему числу данных в эксперименте (например, меньше 5 %), приближения, используемые при этих заменах, и уменьшение степеней свободы на число потерянных данных, замененных таким образом, обычно являются удовлетворительными. Полученные результаты следует интерпретировать с большой осторожностью, особенно если имеются пропущенные результаты в одном виде доз или блоке. В случае неясностей либо в непредвиденных ситуациях следует проконсультироваться со специалистом по биостатистике. Категорически недопустима замена пропущенных результатов в случае испытаний без повторений.

Схема полной рандомизации

В данном случае пропущенное значение может быть заменено средним арифметическим всех других результатов в пределах одной дозы (вида воздействия).

Схема рандомизированных блоков

Пропущенное значение заменяют величиной y' , рассчитанной по формуле (3.2.6.-1):

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)(k-1)}, \quad (3.2.6.-1)$$

где:

B' – сумма результатов для блока, содержащего пропущенное значение;

T' – соответствующее общее количество видов воздействий (доз препаратов);

G' – сумма всех результатов (эффектов), полученных при количественном определении.

Схема латинского квадрата

Пропущенное значение y' рассчитывают по формуле (3.2.6.-2):

$$y' = \frac{k(B'+C'+T') - 2G'}{(k-1)(k-2)}, \quad (3.2.6.-2)$$

где:

B' и C' – суммы результатов соответственно в строках и столбцах, содержащих потерянные значения. В данном случае $k = n$.

Перекрестная схема

Если при использовании перекрестной схемы результат был случайно потерян, следует обратиться к пособию по статистике (например, к руководству D. J. Finney, см. Раздел 10), поскольку применение той или иной формулы зависит от конкретной комбинации видов воздействий (доз).

3.3. МОДЕЛЬ УГЛОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ

3.3.1. ВВЕДЕНИЕ

Данная модель может применяться, например, для некоторых микробиологических количественных определений, в которых независимая переменная представляет собой концентрацию эссенциального фактора роста для микроорганизмов в питательной среде ниже оптимальной концентрации для роста. На рисунке 3.3.1.-I показана модель угловых коэффициентов.

По горизонтальной оси абсцисс откладываются значения доз, начало оси координат соответствует нулевой дозе; значения доз возрастают слева направо. По вертикальной оси ординат откладываются полученные эффекты. Индивидуальные результаты каждого исследования показаны в виде черных точек. Две линии представляют собой зависимости «доза-эффект», рассчитанные для стандартного и испытуемого препаратов исходя из предположения, что они пересекаются друг с другом в точке, соответствующей нулевой дозе. В отличие от модели параллельных линий значения доз не представляются в виде логарифмов.

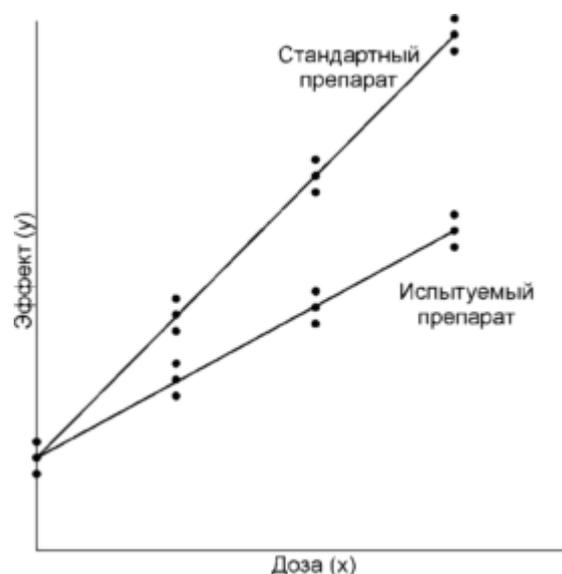


Рисунок 3.3.1.-I. Модель угловых коэффициентов для количественного определения $2 \times 3 + 1$

Так же, как и в случае количественных определений, основанных на модели параллельных линий, важно, чтобы предполагаемая активность была как можно ближе к истинной и, если возможно, желательно приготовить разведения испытуемого и стандартного препаратов с одинаковыми активностями. Чем точнее будет предполагаемая активность, тем ближе линии будут располагаться друг к другу. Отношение угловых коэффициентов представляет собой отношение «истинного» значения активности испытуемого препарата к его предполагаемой активности. Если угол наклона линии испытуемого препарата больше угла наклона линии стандартного препарата, это означает,

что оценка активности была занижена и полученная в ходе испытания рассчитанная активность будет выше предполагаемой активности. Аналогично если угол наклона линии испытуемого препарата меньше угла наклона линии стандартного препарата, то активность была завышена, и расчеты покажут, что рассчитанная активность будет ниже предполагаемой.

При планировании эксперимента все результаты следует проверить на выполнение условий 1, 2 и 3, приведенных в Разделе 3.1. Процедура проведения дисперсионного анализа описана в Разделе 3.3.3, таким образом, он предполагает возможность проверки выполнения условий 4В и 5В, приведенных в Разделе 3.1.

3.3.2. ПЛАН КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Использование методов статистического анализа, приведенных в данном разделе, накладывает на методику количественного определения следующие ограничения:

а) как стандартный, так и испытуемый препараты должны анализироваться при одинаковом числе равномерно распределенных разведений;

б) возможно наличие дополнительной группы экспериментальных объектов, которым не вводят препарат (плацебо-группа или контрольная группа);

с) во всех группах должно быть одинаковое число экспериментальных объектов.

Как уже было отмечено в Разделе 3.1.3, планы количественных определений, которые не отвечают требованиям этих ограничений, могут быть также корректными и обоснованными. Однако описанные здесь простые методы статистического анализа будут в данном случае неприменимы, и следует либо обратиться за помощью к специалисту либо использовать соответствующее программное обеспечение.

Обычно предпочтительным является использование плана исследования с двумя дозами каждого препарата и одной плацебогруппой. Так называемая « $(2h + 1)$ точечная схема с общей нулевой точкой», которая обеспечивает наибольшую точность наряду с возможностью проверки достоверности с учетом ограничений, упомянутых выше. Однако рассчитанная линейность зависимостей не всегда может наблюдаться вплоть до нулевой дозы. Если допускается небольшая потеря точности, можно использовать план, который не предполагает проведение плацебо исследования. В этом случае предпочтительно использовать по три дозы каждого препарата, так называемая « $(3h)$ точечная схема с общей нулевой точкой». Эти дозы вводятся следующим образом:

1) стандартный препарат вводится в максимальной дозе, которая должна быть близка к наивысшей дозе, воспроизводящей средний эффект на линейном отрезке зависимости «доза-эффект», но не превышать ее;

2) две другие дозы равномерно распределяются в промежутке между максимальной и нулевой дозами;

3) испытуемый препарат вводится в соответствующих дозах, определенных исходя из предполагаемой активности вещества.

Возможно использование схем полной рандомизации, рандомизированных блоков или латинских квадратов, описанных в Разделе 3.2.2. Так же, как и для модели параллельных линий, использование любой из этих схем требует корректировки на ошибку суммы квадратов. Ниже описана схема статистического анализа в случае, если со стандартным препаратом сравнивается один или несколько испытуемых препаратов.

3.3.3. ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ

3.3.3.1 (hd + 1)-схема

Результаты проверяют согласно требованиям, описанным в Разделе 3.1 и, если необходимо, проводят их преобразование. Затем для каждого эксперимента и каждого препарата вычисляют среднее значение, как описано в таблице 3.3.3.1-I. Дополнительно рассчитывают среднее значение для плацебо исследований (В).

В таблицах 3.3.3.1.-I–3.3.3.1.-III приведен расчет суммы квадратов для дисперсионного анализа. Сумма квадратов, обусловленная нелинейностью, может быть рассчитана только в том случае, если в план количественного определения было включено по крайней мере по три дозы каждого из препаратов. Остаточную погрешность находят

путем вычитания вариаций, предусмотренных планом эксперимента, из общей вариации для результата исследования (таблица 3.3.3.1.-IV).

Далее дисперсионный анализ завершают следующим образом: каждую сумму квадратов отклонений делят на соответствующее число степеней свободы для вычисления дисперсии (среднего квадрата отклонений). Затем оценивают статистическую значимость отношения дисперсии (среднего квадрата отклонений) для каждой переменной к остаточной погрешности (s^2) (F -отношение). Для этого можно воспользоваться таблицей 8.1 или соответствующей функцией компьютерного программного обеспечения.

Таблица 3.3.3.1.-I

Формулы для d -дозовых количественных определений с использованием модели угловых коэффициентов для каждого препарата и плацебо-испытания

	Стандартный препарат (S)	1-й испытуемый препарат (T)	2-й испытуемый препарат (U и т.д.)
Среднее значение для минимальной дозы	S_1	T_1	U_1
Среднее значение для второй дозы	S_2	T_2	U_2
...
Среднее значение для максимальной дозы	S_d	T_d	U_d
Суммарный результат для препарата	$P_S = S_1 + S_2 + \dots + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + \dots + T_d$	$P_U = \dots$
Линейное произведение	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + \dots + dS_d$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + \dots + dT_d$	$L_U = \dots$
Точка пересечения	$a_S = (4d + 2)P_S - 6L_S$	$a_T = (4d + 2)P_T - 6L_T$	$a_U = \dots$
Угловой коэффициент	$b_S = 2L_S - (d + 1)P_S$	$b_T = 2L_T - (d + 1)P_T$	$b_U = \dots$
Значения доз для групп	$G_S = S_1^2 + \dots + S_d^2$	$G_T = T_1^2 + \dots + T_d^2$	$G_U = \dots$
Нелинейность ^(*)	$J_S = G_S - \frac{P_S^2}{d} - \frac{3b_S^2}{d^3 - d}$	$J_T = G_T - \frac{P_T^2}{d} - \frac{3b_T^2}{d^3 - d}$	$J_U = \dots$

^(*) Не рассчитывается для двухдозовых количественных определений.

Таблица 3.3.3.1.-II

Дополнительные формулы для проведения дисперсионного анализа

$H_B = \frac{nhd^2 - nhd}{hd^2 - hd + 4d + 2}$	$H_I = \frac{n}{4d^3 - 2d^2 - 2d}$	$a = \frac{a_S + a_T + \dots}{h(d^2 - d)}$	$K = \frac{n(B + P_S + P_T + \dots)^2}{hd + 1}$
--	------------------------------------	--	---

Таблица 3.3.3.1.-III

Формулы для расчета сумм квадратов и степеней свободы

Источник вариаций	Степени свободы (f)	Сумма квадратов
Регрессия	h	$SS_{reg} = SS_{treat} - SS_{blank} - SS_{int} - SS_{lin}$
Плацебо исследования	1	$SS_{blank} = H_B(B - a)^2$
Точка пересечения	$h - 1$	$SS_{int} = H_I(a_S^2 + a_T^2 + \dots) - h(d_2 - d)^2 a^2$
Нелинейность ^(*)	$h(d - 2)$	$SS_{lin} = n(J_S + J_T + \dots)$
Группы	hd	$SS_{treat} = n(B^2 + G_S + G_T + \dots) - K$

^(*) Не рассчитывается для двухдозовых количественных определений.

Таблица 3.3.3.1.-IV

Оценка остаточной погрешности (вариации)

Источник вариаций	Степени свободы	Сумма квадратов		
Блоки (строки) ^(*)	$n - 1$	$SS_{block} = hd(R_1^2 + \dots + R_n^2) - K$		
Столбцы ^(**)	$n - 1$	$SS_{col} = hd(C_1^2 + \dots + C_n^2) - K$		
Остаточная вариация ^(***)	{	Полная рандомизация	$(hd + 1)(n - 1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
		Рандомизированный блок	$hd(n - 1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block}$
		Латинский квадрат	$(hd - 1)(n - 1)$	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col}$
Общая вариация	$nhd + n - 1$	$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2$		

Для схемы латинского квадрата эти формулы применимы только в случае, если $n = hd$.

(*) Не рассчитывается для схемы полной рандомизации.

(**) Рассчитывается только для схемы латинских квадратов.

(***) Зависит от схемы рандомизации.

3.3.3.2. (hd)-схема

Для этой схемы используются в основном те же самые формулы, что и для $(hd + 1)$ -схемы, за исключением некоторых небольших различий:

– переменная B исключается из всех формул;

$$K = \frac{n(P_s + P_T + \dots)^2}{hd};$$

– SS_{blank} исключается из дисперсионного анализа;

– число степеней свободы для вариаций, обусловленных группами, равно $hd - 1$;

– число степеней свободы для остаточной погрешности и общей вариации рассчитывают, как описано для модели параллельных линий (см. таблицу 3.2.3.-IV).

Обоснованность (достоверность) количественного определения, активность и границы доверительного интервала определяют, как описано в Разделах 3.3.4 и 3.3.5.

3.3.4. ПРОВЕРКА ДОСТОВЕРНОСТИ

Результаты количественного определения считаются «статистически обоснованными», если результаты, полученные при дисперсионном анализе, удовлетворяют следующим условиям:

1) вариация, обусловленная плацебо в $(hd + 1)$ -схеме, не является статистически значимой, т.е. рассчитанная вероятность не меньше 0,05; это означает, что результаты, полученные при плацебо исследовании, несущественно отличаются от общей точки пересечения и линейная зависимость сохраняется вплоть до нулевой дозы;

2) вариация, связанная с точкой пересечения, не является значимой, т.е. рассчитанная вероятность не меньше 0,05; это означает, что выполняется условие 5В, Раздел 3.1;

3) в количественных определениях, которые включают по крайней мере по три дозы для каждого из препаратов, вариация, обусловленная нелинейностью, не является значимой, т.е. рассчитанная вероятность не меньше 0,05; это означает, что выполняется условие 4В, раздел 3.1.

Статистически значимая вариация, обусловленная проведением плацебо-исследования, свидетельствует о том, что предположение о линейности не подтверждается для диапазона доз возле нулевой точки. Если это отклонение носит скорее систематический, чем случайный характер, наиболее подходящей является (hd) -схема. При этом любые результаты, связанные с плацебо-исследованиями, должны быть исключены.

Если все выполненные статистические исследования свидетельствуют о достоверности обоснованности количественного определения, активность и границы доверительного интервала рассчитываются, как описано в Разделе 3.3.5.

3.3.5. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА

3.3.5.1. (hd + 1)-схема

Общая точка пересечения a' для препаратов может быть вычислена по формуле:

$$a' = \frac{(2d+1)B + (2d-3)ha}{h(2d-3) + 2d+1}, \quad (3.3.5.1.-1)$$

угловой коэффициент для стандартного препарата и аналогично для каждого из других препаратов рассчитывают по формуле:

$$b'_s = \frac{6L_s - 3d(d+1)a'}{2d^3 + 3d^2 + d}. \quad (3.3.5.1.-2)$$

Отношение активностей для каждого из испытуемых препаратов теперь может быть рассчитано следующим образом:

$$R'_T = \frac{b'_T}{b'_S}. \quad (3.3.5.1.-3)$$

Для определения рассчитанной активности R_T полученное по формуле 3.3.5.1.-3 значение нужно умножить на предполагаемую активность A_T испытуемого препарата. Если интервал между последовательными дозами стандартного и испытуемого препаратов не был одинаковым, активность следует умножить на величину I_S/I_T . Следует помнить, что, в отличие от модели параллельных линий, антилогарифмы при этом не вычисляются.

Доверительный интервал для переменной R'_T вычисляется по формуле:

$$CR'_T - K' \pm \sqrt{(C-1)(CR'^2_T + 1) + K'(K' - 2CR'_T)}, \quad (3.3.5.1.-4)$$

где: $C = \frac{b'^2_S}{b'^2_S - s^2 t^2 V_1}$ и $K' = (C-1)V_2$.

V_1 и V_2 связаны с дисперсией и ковариацией числителя и знаменателя R_T . Их рассчитывают по формулам:

$$V_1 = \frac{6}{n(2d+1)} \left(\frac{1}{d(d+1)} + \frac{3}{2(2d+1) + hd(d-1)} \right), \quad (3.3.5.1.-5)$$

$$V_2 = \frac{3d(d+1)}{(3d+1)(d+2) + hd(d-1)}. \quad (3.3.5.1.-6)$$

Доверительный интервал умножается на величину A_T и, если необходимо, на величину I_S/I_T .

3.3.5.2. (hd)-схема

Для этой схемы используются те же формулы, что и для (hd+1)-схемы, за исключением следующих изменений:

$$a' = a, \quad (3.3.5.2.-1)$$

$$V_1 = \frac{6}{n(2d+1)} \left(\frac{1}{d(d+1)} + \frac{3}{h(d-1)} \right), \quad (3.3.5.2.-2)$$

$$V_2 = \frac{3d(d+1)}{(3d+1)+h(d-1)} \quad (3.3.5.2.-3)$$

3.4. РАСШИРЕННЫЕ НЕЛИНЕЙНЫЕ (СИГМОИДНЫЕ) КРИВЫЕ ЗАВИСИМОСТИ «ДОЗА-ЭФФЕКТ»

Эта модель подходит, например, для количественных определений, выполненных иммунохимическими методами, когда требуется анализ вытянутых кривых «доза-эффект». Данная модель показана на Рисунке 3.4.-I.

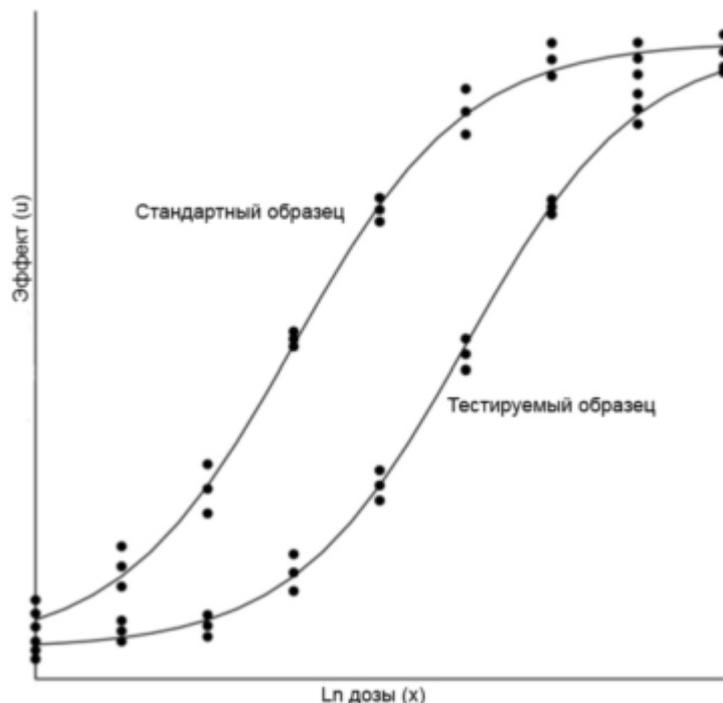


Рисунок 3.4.-I. *Четырехпараметрическая модель логистической кривой*

Логарифмы доз откладывают на горизонтальной оси, начиная слева направо с минимальной концентрации и заканчивая максимальной. Величины эффектов откладывают на вертикальной оси. Индивидуальные эффекты на каждую дозу указывают в виде черных точек. Для стандартного и испытуемого препарата строят 2 кривые зависимости эффектов от натурального логарифма дозы «ln(доза)-эффект».

Общую форму кривых можно легко описать логистической функцией, но возможны и другие формы кривых. Каждую кривую можно охарактеризовать 4 параметрами: верхняя асимптота (α), нижняя асимптота (δ), угловой коэффициент или коэффициент наклона (β), расстояние между кривыми (γ). Поэтому данная модель часто называется четырехпараметрической. Математическое представление кривой зависимости эффектов от натурального логарифма дозы выглядит следующим образом:

$$u = \delta + \frac{\alpha - \delta}{1 + e^{-\beta(x-\gamma)}}$$

Для достоверного испытания необходимо, чтобы кривые стандартного и испытуемого препаратов имели одинаковый угловой коэффициент и максимальный и минимальный уровни эффекта в крайних частях кривых. У кривых может различаться только положение в пространстве (расстояние между ними) – γ . Горизонтальное расстояние между кривыми связано с «истинной активностью» испытуемого препарата. Если испытание проводится регулярно, то на стадии разработки методики достаточно будет проверить условие равенства верхнего и нижнего уровней эффекта и затем регулярно проверять выполнение

данного условия через установленные промежутки времени, а также при изменении используемых материалов или условий проведения испытаний.

Оценки максимального правдоподобия параметров и их доверительных интервалов можно получить, используя соответствующие компьютерные программы. Эти компьютерные программы могут включать некоторые статистические функции, обеспечивающие проверку достоверности полученных результатов. Например, если оценка максимального правдоподобия показывает достоверные отклонения от аппроксимированной модели при допустимых условиях равенства верхней и нижней асимптот и угловых коэффициентов, тогда одно или все эти условия возможно не удовлетворяются.

При использовании логистической модели могут возникнуть различные статистические проблемы, которые, возможно, потребуют различных решений для различных типов количественных определений, и простое суммирование результатов будет неприемлемо. В литературе, посвященной данной тематике, описано большое разнообразие возможных подходов. Поэтому для данного типа анализа рекомендуется воспользоваться профессиональным советом. Тем не менее в Раздел 5.4 включен простой пример, чтобы показать «возможный» путь анализа представленных данных. Краткое обсуждение альтернативных подходов и других статистических соображений представлено в Разделе 7.5.

Если нет возможности получить профессиональный совет или воспользоваться соответствующим программным обеспечением, то имеются следующие альтернативные подходы:

1) если имеется «приемлемая» оценка верхнего (α) и нижнего пределов (δ), то выбирают для всех препаратов дозы со средним значением эффекта (u), приблизительно попадающим в диапазон от 20 % до 80 % максимальной величины пределов, преобразуя

$$y = \ln \left(\frac{u - \delta}{\alpha - u} \right)$$

эффекты, возникающие при введении выбранных доз, по формуле анализа используют модель параллельных линий (см. Раздел 3.2);

2) отбирают диапазон доз, для которых эффекты (u) или соответствующим образом преобразованные эффекты, например, $\ln(u)$, являются приближенно линейными при построении графика зависимости эффектов от натурального логарифма дозы; затем для анализа возможно применить модель параллельных линий (см. Раздел 3.2).

4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ С АЛЬТЕРНАТИВНЫМ ТИПОМ ЭФФЕКТА

4.1. ВВЕДЕНИЕ

В ряде случаев невозможно или слишком трудоемко количественно оценить эффект для каждого экспериментального объекта. В то же время такие результаты, как смерть или симптомы гипогликемии, могут регистрироваться только по тому, наступили они или нет у каждого из экспериментальных объектов, и результат испытания будет зависеть от количества объектов, для которых такой эффект наступил. Такой тип испытания называется количественным определением с альтернативными (дискретными) результатами или количественным определением типа «все или ничего».

Ситуация при этом в целом очень похожа на описанную в разделе 3.1, но вместо n индивидуальных результатов для каждой дозы записывают одно значение, т.е. процент объектов в каждой испытываемой группе, у которых проявился эффект. Если эти результаты представить в виде графика зависимости доли прореагировавших объектов от логарифма дозы, получим не линейную, а сигмоидную кривую (s -образной формы). Для анализа сигмоидной кривой «доза–эффект» применяют математическую функцию, описывающую данную кривую. Обычно используют кумулятивную функцию нормального распределения (характеристическую кривую). Эта функция имеет преимущества с теоретической точки зрения и, очевидно, является предпочтительной, если результат отражает толерантность экспериментальных объектов к оказываемому воздействию. Если результаты связаны с процессами роста, предпочтительной является логистическая функция распределения, хотя

различие в результатах, полученных при использовании этих двух функций, как правило, незначительно.

Максимально правдоподобное оценивание угловых коэффициентов и расположения кривых может быть получено только при использовании итерационных процедур. Существует множество таких статистических процедур, которые приводят к одинаковым результатам, но отличаются по эффективности вследствие разной скорости конвергенции. Одним из наиболее быстрых методов является метод прямой оптимизации функции максимальной правдоподобности (см. Раздел 7.1). Этот метод можно легко выполнить при помощи компьютерного программного обеспечения, имеющего соответствующую встроенную функцию. К сожалению, большинство этих процедур не дает оценки границ доверительного интервала, а методики их вычисления слишком сложны для рассмотрения в данном разделе. Методика, приведенная ниже, не является самой быстрой, но достаточно проста по сравнению с другими методиками. Эта методика может применяться для количественных определений, в которых один или более испытуемых препаратов сравниваются со стандартным препаратом. Кроме этого, должны выполняться следующие условия:

1) зависимость между логарифмом дозы и полученным эффектом должна быть представлена в виде кумулятивной кривой нормального распределения (характеристическая кривая);

2) кривые для стандартного и испытуемого препаратов должны быть параллельны, т.е. иметь одинаковую форму, и могут различаться только расположением по оси абсцисс;

3) теоретически не должно наблюдаться эффекта от введения чрезвычайно малой дозы, и невозможно отсутствие эффекта от введения чрезвычайно большой дозы.

4.2. МЕТОД ПРОБИТ-АНАЛИЗА

Сигмоидную кривую можно преобразовать в прямую линию путем замены каждого эффекта (т.е. доли объектов, у которых появился эффект) в группе с соответствующими значениями кумулятивного нормального эквивалентного отклонения от среднего эффекта. Эти значения, часто называемые «нормиты»⁴, теоретически находятся в интервале от $-\infty$ до $+\infty$. Ранее было принято к каждому «нормиту» прибавлять число 5, таким образом, получали так называемые «пробиты»⁵. Это облегчало проведение расчетов вручную, потому что в этом случае исключались отрицательные результаты. С появлением компьютеров необходимость в прибавлении 5 отпала. Поэтому метод, описываемый ниже, правильнее было бы назвать «метод нормит-анализа». Однако, поскольку термин «метод пробит-анализа» широко распространен и используется в литературе, он сохраняется в данной статье исходя из исторических соображений.

⁴ От англ. «normality unit».

⁵ От англ. «probability unit».

На первый взгляд, кажется, что после линеаризации результатов следует применять метод параллельных линий, описанный в Разделе 3.2. Однако это не так, поскольку для каждой дозы не выполняется условие однородности дисперсий. Дисперсия минимальна, если нормит равен нулю и возрастает как для позитивных, так и для негативных значений нормита. Следовательно, необходимо придать больший вес значениям в средней части кривой и меньший ее крайним частям. Ниже приведено описание такого метода, а также процедура дисперсионного анализа, оценка активности и границ доверительного интервала.

4.2.1. ПОДГОТОВКА РАБОЧИХ ТАБЛИЦ РЕЗУЛЬТАТОВ

В Таблицу 4.2.1.-I заносятся данные по столбцам, номера которых обозначают следующее:

- (1) доза стандартного или испытуемого препарата;
- (2) число n объектов, подвергшихся исследованию;
- (3) число r объектов, у которых получен позитивный эффект в ответ на введение данной дозы;
- (4) логарифм x дозы;

(5) доля позитивных эффектов $p = r / n$ в группе.

Далее начинается первый цикл:

(6) столбец Y при первой итерации заполняют нулями;

(7) соответствующие значения $\Phi = \Phi(Y)$ функции кумулятивного стандартного (характеристической кривой) распределения (см. также Таблицу 8.4).

Значения, заносимые в столбцы (8)–(10), вычисляют по формулам:

$$(8) \quad Z = \frac{e^{-Y^2/2}}{\sqrt{2\pi}}, \quad (4.2.1.-1)$$

$$(9) \quad y = Y + \frac{p - \Phi}{Z}, \quad (4.2.1.-2)$$

$$(10) \quad \omega = \frac{nZ^2}{\Phi - \Phi^2}. \quad (4.2.1.-3)$$

Значения ωx , ωy , ωx^2 , ωy^2 и ωxy , заносимые в столбцы с (11) по (15), можно легко вычислить при помощи данных, находящихся в столбцах (4), (9) и (10), затем вычисляют сумму (Σ) этих значений для каждого из препаратов.

Полученные результаты суммирования переносят из таблицы 4.2.1.-I в столбцы (1)–(6) таблицы 4.2.1.-II, а значения, заносимые в 6 дополнительных столбцов таблицы 4.2.1.-II с (7) по (12), вычисляют следующим образом:

$$(7) \quad S_{xx} = \Sigma \omega x^2 - \frac{(\Sigma \omega x)^2}{\Sigma \omega}, \quad (4.2.1.-4)$$

$$(8) \quad S_{xy} = \Sigma \omega xy - \frac{(\Sigma \omega x)(\Sigma \omega y)}{\Sigma \omega}, \quad (4.2.1.-5)$$

$$(9) \quad S_{yy} = \Sigma \omega y^2 - \frac{(\Sigma \omega y)^2}{\Sigma \omega}, \quad (4.2.1.-6)$$

$$(10) \quad \bar{x} = \frac{\Sigma \omega x}{\Sigma \omega}, \quad (4.2.1.-7)$$

$$(11) \quad \bar{y} = \frac{\Sigma \omega y}{\Sigma \omega}. \quad (4.2.1.-8)$$

Теперь можно вычислить общий угловой коэффициент b спрямленной характеристической кривой:

$$b = \frac{\Sigma S_{xy}}{\Sigma S_{xx}}. \quad (4.2.1.-9)$$

Точку пересечения a с осью ординат определяют одинаково как для стандартного, так и для испытуемого препаратов:

$$(12) \quad a = \bar{y} - b\bar{x}. \quad (4.2.1.-10)$$

Значения, приведенные в столбце (6) первой рабочей таблицы, теперь заменяют на значения $Y = a + bx$ и повторяют цикл вычислений до тех пор, пока разница между двумя последовательными циклами не станет достаточно малой (например, максимальная разница Y между двумя соседними циклами будет меньше 10^{-8}).

Таблица 4.2.1.-I

Первая рабочая таблица

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
	доза	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	ω	ωx	ωy	ωx^2	ωy^2	ωxy
S

										$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$
T

										$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$
и т.д.															

Таблица 4.2.1.-II

Вторая рабочая таблица

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	$S\omega$	$S\omega x$	$S\omega y$	$S\omega x^2$	$S\omega y^2$	$S\omega xy$	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	\bar{x}	\bar{y}	a
S
T
и т.д.
							$\Sigma =$	$\Sigma =$				

4.2.2. ПРОВЕРКА ДОСТОВЕРНОСТИ

Перед тем, как начать вычисление активностей и границ доверительных интервалов, следует оценить достоверность (обоснованность) результатов количественного определения. Если для каждого из препаратов было проведено исследование не менее чем 3 доз, то отклонение от линейности может быть рассчитано следующим образом: к таблице 4.2.1.-II добавляют тринадцатый столбец и заполняют значениями:

$$S_{yy} = \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} \quad (4.2.2.-1)$$

Суммарное значение данных этого столбца является мерой отклонения от линейности и приблизительно подчиняется χ^2 -распределению со степенями свободы, равными $N-2h$. Значимость этой величины можно оценить при помощи таблицы 8.3 или соответствующей функции компьютерного программного обеспечения. Если при уровне вероятности 0,05 рассчитанная величина является значимой, результаты количественного определения следует отклонить (см. Раздел 4.2.4).

Если не выявлено значимого отклонения от линейной регрессии, проверяют отклонение от параллельности при уровне значимости 0,05, для чего рассчитывают значение при числе степеней свободы, равном $h-1$:

$$\chi^2 = \sum \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} - \frac{(\sum S_{xy})^2}{\sum S_{xx}} \quad (4.2.2.-2)$$

4.2.3. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА

Если нет никаких признаков значительного отклонения от линейности и параллельности, вычисляют натуральный логарифм отношения активностей M'_T по формуле:

$$M'_T = \frac{a_T - a_S}{b} \quad (4.2.3.-1)$$

Вычисляют антилогарифм этого значения. Далее, приняв значения $t = 1,96$ и $s = 1$, рассчитывают границы доверительного интервала как антилогарифм значения:

$$CM'_T - (C-1)(\bar{x}_S - \bar{x}_T) \pm \sqrt{(C-1)(V \sum S_{xx} + C(M'_T - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2)} \quad (4.2.3.-2)$$

где: $C = \frac{b^2 \sum S_{xx}}{b^2 \sum S_{xx} - s^2 t^2}$, а $V = \frac{1}{\sum \omega} + \frac{1}{\sum \omega}$

4.2.4. НЕДОСТОВЕРНЫЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если отклонения от линейности, описанные в Разделе 4.2.2, являются статистически значимыми, результаты количественного определения обычно признают недостоверными. Если существуют основания для сохранения результатов количественного определения, формулы несколько изменяются. Величину t берут равной t -значению ($p = 0,05$) с тем же числом степеней свободы, которое использовалось при проверке линейности. Значение s^2 берут равным значению χ^2 , деленному на то же число степеней свободы (обычно это значение больше 1).

Испытание на параллельность также несколько видоизменяется. Значение χ^2 для непараллельности делят на соответствующее число степеней свободы. Полученное значение делится на рассчитанное выше значение s^2 , для определения F -отношения с $h-1$ и $N-2h$ степенями свободы, которое оценивают обычным способом при уровне значимости 0,05.

4.3. МЕТОД ЛОГИТ-АНАЛИЗА

Как отмечалось в Разделе 4.1, в некоторых случаях метод логит-анализа является наиболее приемлемым. Название метода происходит от названия функции логит-преобразования, которая является обратной функции логистического распределения. Процедура в этом случае аналогична той, которая описана для метода пробит-анализа, за исключением того, что видоизменяются две формулы для расчета значений Φ и Z .

$$\Phi = \frac{1}{1 + e^{-r}} \quad (4.3.-1)$$

$$Z = \frac{e^{-r}}{(1 + e^{-r})^2} \quad (4.3.-2)$$

4.4. ДРУГИЕ ФОРМЫ КРИВОЙ

Для анализа количественных результатов тестов, предусмотренных Фармакопеей, почти всегда приемлемыми являются методы пробит- и логит-анализа. Однако, если форма кривой зависимости «ln(доза)-эффект» отличается от форм этих двух кривых, следует взять другую зависимость – Φ . Z в этом случае берется как первая производная от Φ .

Например, если выявляется, что кривая несимметрична, приемлемым может быть распределение Гомпертца (*Gompertz*) (метод гомпит-анализа). В этом случае $\Phi = 1 - e^{-e^r}$, а $Z = e^{r-e^r}$.

4.5. МЕДИАННАЯ ЭФФЕКТИВНАЯ ДОЗА

Для некоторых типов количественных определений необходимо определить медианную эффективную дозу, т.е. дозу, позитивный эффект на которую дают 50 % экспериментальных объектов (ED_{50}). Для определения этой дозы можно применить метод пробит-анализа, но поскольку при этом нет необходимости сравнивать эту дозу со стандартным препаратом, формулы несколько отличаются.

Примечание: стандартный препарат может эпизодически применяться при использовании данного метода с целью проверки достоверности количественного определения. Обычно результаты количественного определения считаются достоверными, если рассчитанное значение ED_{50} для стандартного препарата достаточно близко к аттестованному значению ED_{50} . Значение термина «достаточно близко» в данном контексте зависит от требований, предъявляемых в конкретной монографии на лекарственный препарат.

Подготовка рабочих таблиц результатов, полученных для испытуемых препаратов и при необходимости для стандартного, описана в Разделе 4.2.1. Проверка линейности описана в Разделе 4.2.2. Проверка параллельности для данного типа количественного определения не требуется. Значение ED_{50} для испытуемого препарата T (и аналогично для других тестируемых образцов) рассчитывается, как описано в Разделе 4.2.3, при этом изменяются формулы 4.2.3.-1 и 4.2.3.-2.

$$M'_T = \frac{-a_T}{b}, \quad (4.5.-1)$$

$$CM'_T - (C-1)\bar{x}_T \pm \sqrt{(C-1)(V \sum S_{xx} + C(M'_T + \bar{x}_T)^2)}, \quad (4.5.-2)$$

$$V = \frac{1}{\sum_T \omega}$$

где ω , а значение C остается без изменений.

5. ПРИМЕРЫ

В данном разделе приведены примеры, иллюстрирующие применение вышеописанных формул. Примеры подбирались главным образом с целью проиллюстрировать статистические методы обработки результатов. Их выбор в каждом случае не означает преимущество того или иного метода количественного определения перед альтернативными методами, которые допускаются конкретной частной статьей. Для того, чтобы сделать примеры подходящими для проверки достоверности работы компьютерных программ, в них приводится большее количество десятичных знаков, чем это обычно необходимо на практике. Следует также отметить, что существуют и альтернативные эквивалентные методики расчетов. Результаты, полученные при использовании этих методик, должны быть точно такими же, как и те, которые приводятся в данных примерах.

5.1. МОДЕЛЬ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ЛИНИЙ.

5.1.1. ДВУХДОЗОВОЕ МНОГОКРАТНОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СХЕМЫ ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ.

Количественное определение активности кортикотропина путем подкожной инъекции у крыс.

Стандартный препарат вводили в дозах от 0,25 до 1,0 ЕД на 100 г массы тела. Предполагалось, что оба испытуемых препарата имели активность 1 ЕД/мг и вводились в тех же количествах, что и стандартный. Значения эффектов и средние значения приведены в таблице 5.1.1.-I.

Измеряемый эффект y – масса аскорбиновой кислоты (мг) на 100 г надпочечника

	Стандартный препарат S		Испытуемый препарат T		Испытуемый препарат U	
	S_1	S_2	T_1	T_2	U_1	U_2
	300	289	310	230	250	236
	310	221	290	210	268	213
	330	267	360	280	273	283
	290	236	341	261	240	269
	364	250	321	241	307	251
	328	231	370	290	270	294
	390	229	303	223	317	223
	360	269	334	254	312	250
	342	233	295	216	320	216
	306	259	315	235	265	265
Среднее	332,0	248,4	323,9	244,0	282,2	250,0

Графическое представление результатов (рисунок 5.5.1.-I) не дает поводов сомневаться в однородности дисперсий и нормальности распределения данных, но возникают некоторые сомнения относительно параллельности результатов для препарата U .

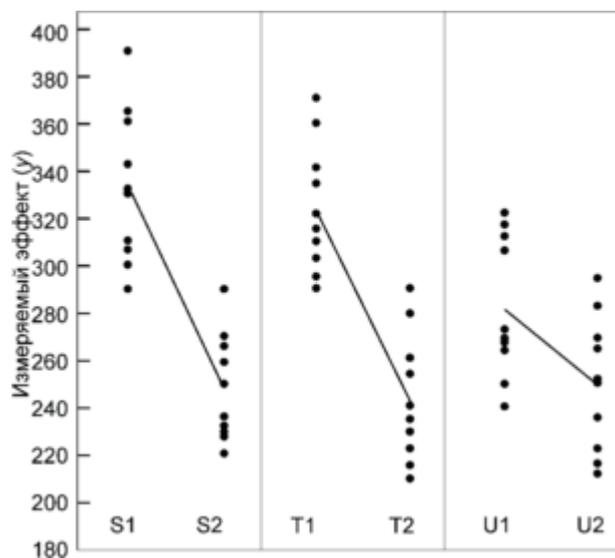


Рисунок 5.1.1.-I

Расчет по формулам, приведенным в таблицах 3.2.3.-I и 3.2.3.-II, дал следующие результаты:

$$\begin{aligned}
 P_S &= 580,4, & L_S &= -41,8, \\
 P_T &= 567,9, & L_T &= -39,95, \\
 P_U &= 532,2, & L_U &= -16,1, \\
 N_P &= \frac{10}{2} = 5, & N_L &= \frac{120}{6} = 20.
 \end{aligned}$$

Далее проводят дисперсионный анализ по формулам, приведенным в таблицах 3.2.3.-III и 3.2.3.-IV. Результаты приведены в таблице 5.1.1.-II.

Таблица 5.1.1.-II

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Препараты	2	6 256,6	3 128,3		
Линейная регрессия	1	63 830,8	63 830,8	83,38	0,000
Непараллельность	2	8 218,2	4 109,1	5,37	0,007
Группы (дозы)	5	78 305,7			
Остаточная вариация	54	41 340,9	765,57		
Общая вариация	59	119 646,6			

Анализ подтвердил высокую значимость линейной регрессии. Отклонение от параллельности для препарата *U* по сравнению со стандартным препаратом, которое ожидалось на основании анализа графического представления результатов, тем не менее также оказалось значимым ($p = 0,0075$). По этой причине препарат *U* исключают и анализ повторяют только для препарата *T* и стандартного препарата.

Таблица 5.1.1.-III

Дисперсионный анализ без препарата U

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонений)	F-отношение	Вероятность
Препараты	1	390,6	390,6		
Линейная Регрессия	1	66 830,6	66 830,6	90,5	0,000
Непараллельность	1	34,2	34,2	0,05	0,831
Группы (дозы)	3	67 255,5			
Остаточная вариация	36	26 587,3	738,54		
Общая вариация	39	93 842,8			

Анализ, проведенный без препарата *U*, свидетельствует о соответствии условиям как линейности регрессии, так и параллельности, что позволяет перейти к расчету активности. Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты:

– общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{20(-41,8 - 39,95)}{\ln 4 \times 10 \times 2} = -58,970 ;$$

– натуральный логарифм отношения активностей:

$$M'_T = \frac{567,9 - 580,4}{2 \times (-58,970)} = 0,1060 ,$$

$$C = \frac{66830,6}{66830,6 - 738,54 \times 2,028^2} = 1,0476 ,$$

$$V = \frac{66830,6}{(-58,970)^2 \times 2 \times 10} = 0,9609 ;$$

– натуральный логарифм доверительных интервалов:

$$1,0476 \times 0,1060 \pm \sqrt{0,0476 \times (1,0476 \times 0,1060^2 + 2 \times 0,9609)} = 0,1110 \pm 0,3034 .$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 1,11 при 95 % доверительном интервале от 0,82 до 1,51.

Умножение на предполагаемую активность препарата T дает истинную активность 1,11 ЕД/мг при 95 % доверительном интервале от 0,82 до 1,51 ЕД/мг.

5.1.2. ТРЕХДОЗОВОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СХЕМЫ ЛАТИНСКИХ КВАДРАТОВ

Количественное определение активности антибиотика методом диффузии в агар с использованием прямоугольного планшета. Стандартный препарат имел установленную (аттестованную) активность, равную 4855 МЕ/мг. Предполагаемая активность испытуемого препарата принималась равной 5600 МЕ/мг. Исходные растворы готовились следующим образом: 25,2 мг стандартного препарата растворяли в 24,5 мл растворителя и 21,4 мг испытуемого препарата растворяли в 23,95 мл растворителя. Для анализа исходные растворы сначала разводили в соотношении 1/20, а затем, используя степень разведения 1,5.

Латинские квадраты строились при помощи метода, описанного в Разделе 8.6 (см. таблицу 5.1.2.-I). Результаты, полученные в ходе данного количественного определения, приведены в таблице 5.1.2.-II (зоны ингибирования роста в мм×10). Средние значения для групп приведены в таблице 5.1.2.-III. Графическое представление данных (см. Рисунок 5.1.2.-I) не дает поводов сомневаться в нормальности распределения и однородности дисперсий.

Таблица 5.1.2.-I

Расположение препаратов и их доз в планшете

	1	2	3	4	5	6
1	S_1	T_1	T_2	S_3	S_2	T_3
2	T_1	T_3	S_1	S_2	T_2	S_3
3	T_2	S_3	S_2	S_1	T_3	T_1
4	S_3	S_2	T_3	T_1	S_1	T_2
5	S_2	T_2	S_3	T_3	T_1	S_1
6	T_3	S_1	T_1	T_2	S_3	S_2

Таблица 5.1.2.-II

Измеренные зоны ингибирования роста в мм×10

	1	2	3	4	5	6	Среднее по строкам
1	161	160	178	187	171	194	175,2 = R_1
2	151	192	150	172	170	192	171,2 = R_2
3	162	195	174	161	193	151	172,7 = R_3
4	194	184	199	160	163	171	178,5 = R_4
5	176	181	201	202	154	151	177,5 = R_5
6	193	166	161	186	198	182	181,0 = R_6
Среднее столбцов	172,8 = C_1	179,7 = C_2	177,2 = C_3	178,0 = C_4	174,8 = C_5	173,5 = C_6	

Таблица 5.1.2.-III

Средние значения

	Стандартный препарат S			Испытуемый препарат T		
	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3
Среднее	158,67	176,50	194,50	156,17	174,67	195,50

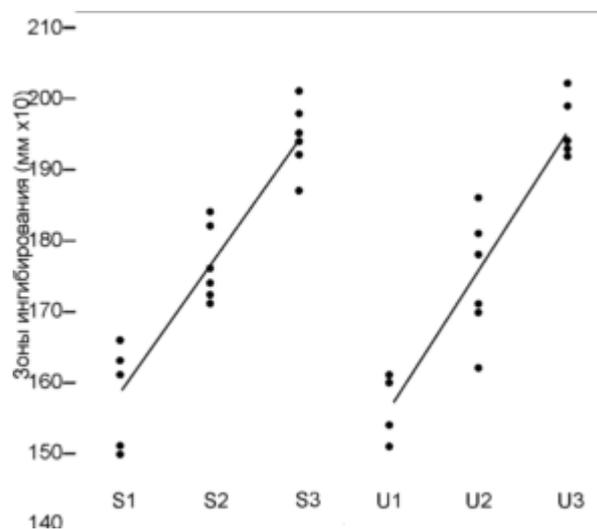


Рисунок 5.1.2.-I.

Используя формулы, приведенные в таблицах 3.2.3.-I и 3.2.3.-II, получаем следующие результаты:

$$P_S = 529,667, \quad L_S = 35,833,$$

$$P_T = 526,333, \quad L_T = 39,333,$$

$$H_P = \frac{6}{3} = 2, \quad H_L = \frac{72}{24} = 3.$$

Далее проводят дисперсионный анализ по формулам, приведенным в таблицах 3.2.3.-III и 3.2.3.-IV. Результаты приведены в таблице 5.1.2.-IV.

Таблица 5.1.2.-IV

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Препараты	1	11,1111	11,1111		
Регрессия линейная	1	8475,0417	8475,0417	408,1	0,000
Непараллельность	1	18,3750	18,3750	0,885	0,358
Нелинейность	2	5,4722	2,7361	0,132	0,877
Группы (дозы)	5	8510			
Строки	5	412	82,40	3,968	0,012
Столбцы	5	218,6667	43,73	2,106	0,107
Остаточная вариация	20	415,3333	20,7667		
Общая вариация	35	9556			

Анализ показывает значительные различия между строками. Это означает, что использование схемы латинских квадратов обеспечивает в данном случае более высокую точность по сравнению со схемой полной рандомизации. Высокая значимость регрессии, а также отсутствие значимого отклонения индивидуальных линий регрессии от параллельности и линейности подтверждают, что результаты количественного определения пригодны для расчета активности.

Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты: – общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{3 \times (35,833 + 39,333)}{\ln(1,5) \times 6 \times 2} = 46,346$$

– натуральный логарифм отношения активностей:

$$M'_T = \frac{526,333 - 529,667}{3 \times 46,346} = -0,023974$$

$$C = \frac{8475,0417}{8475,0417 - 20,7667 \times 2,086^2} = 1,0108$$

$$V = \frac{8475,0417}{46,346^2 \times 3 \times 6} = 0,2192$$

– натуральный логарифм доверительных интервалов:

$$1,0108 \times (-0,0240) \pm \sqrt{0,0108 \times (-0,0240)^2 + 2 \times 0,2192} = -0,02423 \pm 0,06878$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 0,9763 при 95 % доверительном интервале от 0,9112 до 1,0456.

Поскольку разведения, приготовленные исходя из предполагаемой активности, не были точно эквивалентными, следует ввести поправочный коэффициент

$$\frac{4855 \times 25,2 / 24,5}{5600 \times 21,4 / 23,95} = 0,99799$$

. Перемножая данный коэффициент и предполагаемую активность препарата 5600 МЕ/мг, получаем рассчитанную активность 5456 МЕ/ мг при 95 % доверительном интервале от 5092 до 5843 МЕ/мг.

5.1.3. ЧЕТЫРЕХДОЗОВАЯ СХЕМА РАНДОМИЗИРОВАННЫХ БЛОКОВ

Количественное определение активности антибиотика турбидиметрическим методом

Данное количественное определение проводят с целью установления активности антибиотика в международных единицах на флакон. Стандартный препарат имеет установленную активность 670 МЕ/мг. Предполагаемая активность испытуемого препарата принимается равной 20 000 ЕД/флакон. Исходя из этих данных, исходные растворы готовились следующим образом: 16,7 мг стандартного препарата растворяли в 25 мл растворителя, а содержимое одного флакона испытуемого препарата растворяли в 40 мл растворителя. Для анализа исходные растворы сначала разводили в соотношении 1/40, а затем, используя степень разведения 1,5. Пробирки размещали в водяной бане в соответствии со схемой рандомизированного блока (см. Раздел 8.5). Полученные результаты приведены в таблице 5.1.3.-I.

Таблица 5.1.3.-I

Показатель оптической плотности суспензий ($\times 1000$)

Блок	Стандартный препарат S				Испытуемый препарат T				Среднее
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	
1	252	207	168	113	242	206	146	115	181,1
2	249	201	187	107	236	197	153	102	179,0
3	247	193	162	111	246	197	148	104	176,0
4	250	207	155	108	231	191	159	106	175,9
5	235	207	140	98	232	186	146	95	167,4
Среднее	246,6	203,0	162,4	107,4	237,4	195,4	150,4	104,4	

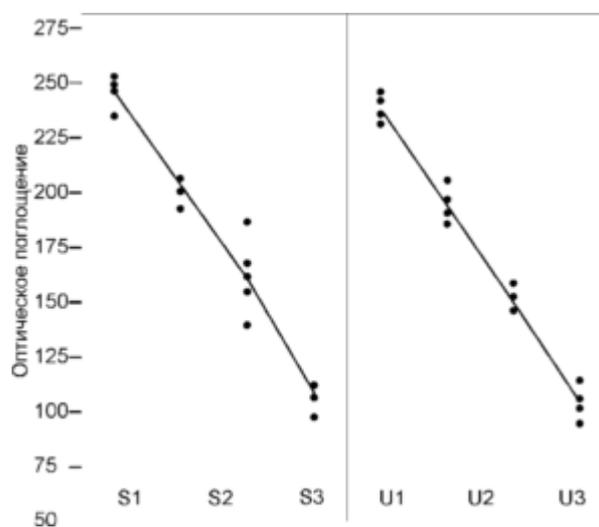


Рисунок 5.1.3.-I.

Анализ рисунка 5.1.3.-I не дает оснований сомневаться в справедливости предположения о нормальности распределения данных и однородности дисперсий. Стандартное отклонение S_3 несколько велико, но не является причиной для беспокойства.

Используя формулы, приведенные в таблицах 3.2.3.-I и 3.2.3.-II, получаем следующие результаты:

$$\begin{aligned}
 P_S &= 719,4, & L_S &= -229,1, \\
 P_T &= 687,6, & L_T &= -222, \\
 N_P &= \frac{5}{4} = 1,25, & N_L &= \frac{60}{60} = 1.
 \end{aligned}$$

Далее проводим дисперсионный анализ по формулам, приведенным в таблицах 3.2.3.-III и 3.2.3.-IV. Полученные результаты приведены в таблице 5.1.3.-II.

Таблица 5.1.3.-II

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Препараты	1	632,025	632,025		
Линейная регрессия	1	101 745,6	101 745,6	1887,1	0,000
Непараллельность	1	25,205	25,205	0,467	0,500
Нелинейность	4	259,14	64,785	1,202	0,332
Группы	7	102 662			
Блоки	4	876,75	219,188	4,065	0,010
Остаточная вариация	28	1 509,65	53,916		
Общая вариация	39	105 048,4			

Следует отметить значительное различие между блоками. Это означает, что применение схемы рандомизированных блоков позволяет добиться более высокой точности оценки. Высокая значимость регрессии, а также отсутствие значимого отклонения от параллельности и линейности подтверждают, что результаты количественного определения пригодны для расчета активности.

Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты: – общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{1 \times (-229,1 - 222)}{\ln(1,5) \times 5 \times 2} = -111,255$$

– натуральный логарифм отношения активностей:

$$M'_r = \frac{687,6 - 719,4}{4 \times (-111,255)} = 0,071457$$

$$C = \frac{101745,6}{101745,6 - 53,916 \times 2,048^2} = 1,00223$$

$$V = \frac{101745,6}{(-111,255)^2 \times 4 \times 5} = 0,4110$$

– натуральный логарифм доверительных интервалов:

$$1,00223 \times 0,0715 \pm \sqrt{0,00223 \times 0,0715^2 + 2 \times 0,4110} = 0,07162 \pm 0,04293$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 1,0741 при 95 % доверительном интервале от 1,0291 до 1,1214. Поскольку разведения, приготовленные исходя из предполагаемой активности, не были точно эквивалентными, следует ввести

$$\frac{670 \times 16,7 / 25}{20000 \times 1 / 40} = 0,89512$$

поправочный коэффициент . Перемножив данный коэффициент и предполагаемую активность препарата 20 000 МЕ/флакон, получаем рассчитанную активность 19 228 МЕ/флакон при 95 % доверительном интервале от 18 423 до 20 075 МЕ/флакон.

5.1.4. ПЯТИДОЗОВОЕ МНОГОКРАТНОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СХЕМЫ ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ

Количественное определение in vitro активности трех вакцин против Гепатита В по сравнению со стандартным препаратом.

Для каждой из вакцин подготавливали по три независимые серии разведений, каждая из которых состоит из пяти двукратных разведений. После определенных подготовительных операций, предусмотренных методикой количественного определения, измеряли оптические плотности растворов. Результаты приведены в таблице 5.1.4.-I.

Таблица 5.1.4.-I

Оптические плотности растворов вакцин

Разведение	Стандартный препарат S			Испытуемый препарат T		
	1:16 000	0,043	0,045	0,051	0,097	0,097
1:8 000	0,093	0,099	0,082	0,167	0,157	0,178
1:4 000	0,159	0,154	0,166	0,327	0,355	0,345
1:2 000	0,283	0,295	0,362	0,501	0,665	0,576
1:1 000	0,514	0,531	0,545	1,140	1,386	1,051

Разведение	Испытуемый препарат U			Испытуемый препарат V		
	1:16 000	0,086	0,071	0,073	0,082	0,082
1:8 000	0,127	0,146	0,133	0,145	0,144	0,173
1:4 000	0,277	0,268	0,269	0,318	0,306	0,316
1:2 000	0,586	0,489	0,546	0,552	0,551	0,624
1:1 000	0,957	0,866	1,045	1,037	1,039	1,068

Как известно, натуральные логарифмы оптических плотностей раствора имеют линейную зависимость от логарифмов доз растворенного вещества. Средние результаты логарифмического преобразования оптических плотностей приведены в таблице 5.1.4.-II.

Графическое представление результатов не выявило каких-либо необычных закономерностей расположения данных (см. рисунок 5.1.4.-I).

Таблица 5.1.4.-II

Средние значения натуральных логарифмов оптических плотностей растворов

S_1	-3,075	T_1	-2,344	U_1	-2,572	V_1	-2,485
S_2	-2,396	T_2	-1,789	U_2	-2,002	V_2	-1,874
S_3	-1,835	T_3	-1,073	U_3	-1,305	V_3	-1,161
S_4	-1,166	T_4	-0,550	U_4	-0,618	V_4	-0,554
S_5	-0,635	T_5	0,169	U_5	-0,048	V_5	0,047

Используя формулы, приведенные в таблицах 3.2.3.-I и 3.2.3.-II, получаем следующие результаты:

$$\begin{aligned}
 P_S &= -9,108, & L_S &= 6,109, \\
 P_T &= -5,586, & L_T &= 6,264, \\
 P_U &= -6,544, & L_U &= 6,431, \\
 P_V &= -6,027, & L_V &= 6,384, \\
 H_P &= \frac{3}{5} = 0,6, & H_L &= \frac{36}{120} = 0,3.
 \end{aligned}$$

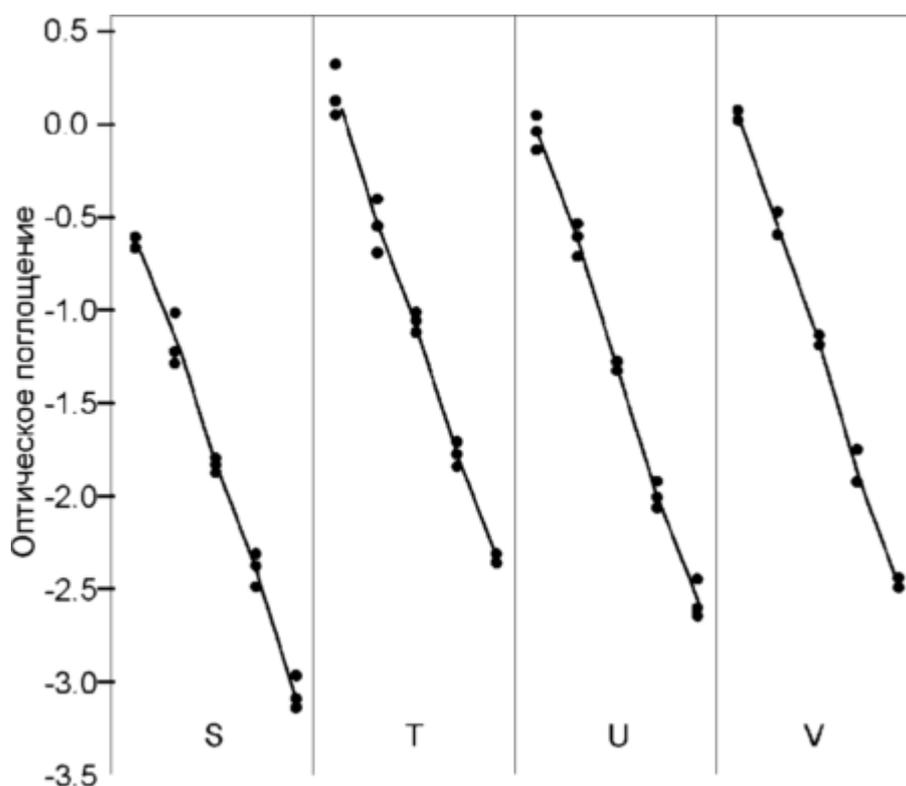


Рисунок 5.1.4.-I.

Далее проводим дисперсионный анализ по формулам, приведенным в таблицах 3.2.3.-III и 3.2.3.-IV. Полученные результаты приведены в таблице 5.1.4.-III.

Таблица 5.1.4.-III

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонений)	F-отношение	Вероятность
Препараты	3	4,475	1,492		

Линейная регрессия	1	47,58	47,58	7126	0,000
Непараллельность	3	0,0187	0,006	0,933	0,434
Нелинейность	12	0,0742	0,006	0,926	0,531
Группы	19	52,152			
Остаточная вариация	40	0,267	0,0067		
Общая вариация	59	52,42			

Высокая значимость линейной регрессии, а также отсутствие значимого отклонения от параллельности и линейности подтверждают, что результаты данного количественного определения пригодны для расчета активности. Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты:

– общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{0,3 \times (6,109 + 6,264 + 6,431 + 6,384)}{\ln 2 \times 3 \times 4} = 0,90848 ;$$

– натуральный логарифм отношения активностей:

$$M'_T = \frac{-5,586 - (-9,108)}{5 \times 0,90848} = 0,7752 ;$$

$$C = \frac{47,58}{47,58 - 0,0067 \times 2,021^2} = 1,00057 ;$$

$$V = \frac{47,58}{0,9085^2 \times 5 \times 3} = 3,8436 ;$$

– натуральный логарифм доверительных интервалов для испытуемой вакцины Т:

$$1,00057 \times 0,7752 \pm \sqrt{0,00057 \times (1,00057 \times 0,7752^2 + 2 \times 3,8436)} = 0,7756 \pm 0,0689$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей вакцин, равное 2,171 при 95 % доверительном интервале от 2,027 до 2,327. Все образцы имеют установленную (аттестованную) активность 20 мкг протеина/мл и, следовательно, найденная активность испытуемого препарата Т равна 43,4 мкг протеина/мл при 95 % доверительном интервале от 40,5 до 46,5 мкг протеина/мл.

Аналогичным образом вычисляют активность и доверительные интервалы для других испытуемых препаратов. Полученные результаты приведены в таблице 5.1.4.-IV.

Таблица 5.1.4.-IV

Окончательные результаты оценки активностей испытуемых вакцин (мкг протеина/мл) и 95 % доверительные интервалы

	Нижняя граница	Оценка	Верхняя граница
Вакцина Т	40,5	43,4	46,5
Вакцина U	32,9	35,2	37,6
Вакцина V	36,8	39,4	42,2

5.1.5. ДВОЙНАЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ СХЕМА

Количественное определение активности инсулина путем подкожной инъекции у кроликов

Стандартный препарат вводился в дозах 1 и 2 ЕД/мл. Эквивалентные дозы испытуемого препарата неизвестной активности назначались исходя из предполагаемой активности 40 ЕД/мл. Кроликам подкожно вводили 0,5 мл соответствующих растворов в

соответствии со схемой, приведенной в таблице 5.1.5.-I. Полученные результаты приведены в таблице 5.1.5.-II и на рисунке 5.1.5.-I. Высокое значение дисперсии свидетельствует о наличии статистически значимых различий между кроликами и необходимости использовать перекрестную схему исследования.

Таблица 5.1.5.-I

Планирование исследования

	Группа кроликов			
	1	2	3	4
День 1	S_1	S_2	T_1	T_2
День 2	T_2	T_1	S_2	S_1

Таблица 5.1.5.-II

Эффект у: сумма результатов содержания глюкозы в крови (мг/100 мл) через 1 час и 2,5 часа

	Группа 1		Группа 2		Группа 3		Группа 4	
	S_1	T_2	S_2	T_1	T_1	S_2	T_2	S_1
	112	104	65	72	105	91	118	144
	126	112	116	160	83	67	119	149
	62	58	73	72	125	67	42	51
	86	63	47	93	56	45	64	107
	52	53	88	113	92	84	93	117
	110	113	63	71	101	56	73	128
	116	91	50	65	66	55	39	87
	101	68	55	100	91	68	31	71
Среднее	95,6	82,8	69,6	93,3	89,9	66,6	72,4	106,8

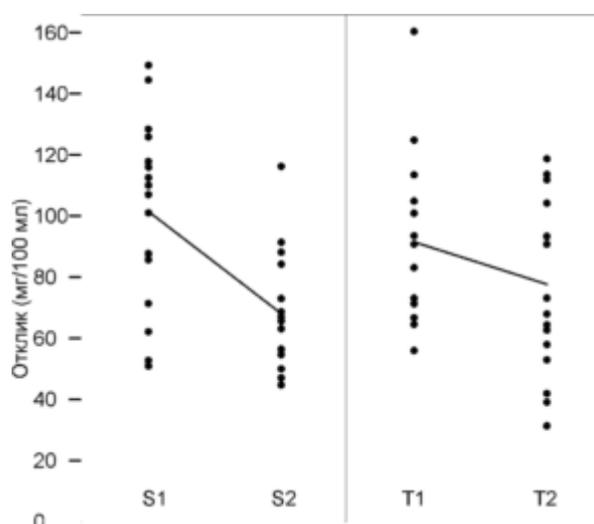


Рисунок 5.1.5.-I

Для рассматриваемой схемы количественного определения применение дисперсионного анализа является более сложным, чем для рассмотренных ранее схем, потому что компонент вариации, обусловленный параллельностью, не является независимым от компонента, обусловленного различием между кроликами. Поэтому проверка параллельности линий регрессий требует дополнительного введения второго поправочного коэффициента для ошибки среднего квадрата отклонений (дисперсии), который вычисляется путем вычитания компонента параллельности и пар «взаимодействующих» компонентов из компонента, связанного с различием между кроликами.

За счет повторений в каждой из групп в дисперсионном анализе присутствуют три пары «взаимодействующих» компонентов: дни×препараты; дни×регрессия; дни×параллельность.

Эти коэффициенты характеризуют тенденцию компонентов (препараты, регрессия и параллельность) изменяться в разные дни испытаний (в серии «изо-дня-в-день»). Таким образом, соответствующие F -отношения обеспечивают проверку этих компонентов оценки достоверности количественного определения. Если статистическая значимость полученных оценок F -отношений является высокой, следует с большой осторожностью интерпретировать результаты количественного определения и, если это возможно, необходимо повторить количественное определение активности инсулина.

Дисперсионный анализ проводится с использованием формул, приведенных в таблицах 3.2.3.-I–3.2.3.-III, отдельно как для каждого дня, так и для объединенного набора данных. Используя формулы, приведенные в таблицах 3.2.3.-I и 3.2.3.-II, получаем следующие результаты:

День 1:	$P_S = 165,25$	$L_S = -13$
	$P_T = 162,25$	$L_T = -8,75$
	$H_P = \frac{8}{2} = 4$	$H_L = \frac{96}{6} = 16$
День 2:	$P_S = 173,38$	$L_S = -20,06$
	$P_T = 176,00$	$L_T = -5,25$
	$H_P = \frac{8}{2} = 4$	$H_L = \frac{96}{6} = 16$
Объединенные данные:	$P_S = 196,31$	$L_S = -16,53$
	$P_T = 169,13$	$L_T = -7,00$
	$H_P = \frac{16}{2} = 8$	$H_L = \frac{192}{6} = 32$

Используя формулы, приведенные в таблице 3.2.3.-III, получаем следующие результаты:

День 1	День 2	Объединенные данные
$SS_{prep} = 18,000$	$SS_{prep} = 13,781$	$SS_{prep} = 0,141$
$SS_{reg} = 3784,5$	$SS_{reg} = 5125,8$	$SS_{reg} = 8859,5$
$SS_{par} = 144,5$	$SS_{par} = 1755,3$	$SS_{par} = 1453,5$

Коэффициенты взаимодействия рассчитывают как: «День1 + День2 – Объединенные данные».

$$SS_{daysxprep} = 31,64,$$

$$SS_{daysxreg} = 50,77,$$

$$SS_{daysxpar} = 446,27.$$

Дополнительно рассчитывают сумму квадратов отклонений вследствие вариации, обусловленной разными днями испытаний (в серии «изо-дня-в-день»):

$$SS_{days} = \frac{1}{2} N(D_1^2 + D_2^2) - K = 478,52$$

и сумму квадратов отклонений вследствие вариаций в блоках (различие между кроликами):

$$SS_{\text{block}} = 2 \sum B_i^2 - K = 39794,7,$$

где B_i – среднее значение наблюдаемого эффекта в пересчете на одного кролика.

Далее проводят дисперсионный анализ, результаты которого приведены в таблице 5.1.5.-III. Дисперсионный анализ подтверждает, что полученные данные удовлетворяют необходимым условиям достоверности оценки активности инсулина: высокая статистическая значимость линейной регрессии, отсутствие статистически значимых отклонений от параллельности и незначимость всех трех коэффициентов взаимодействия.

Таблица 5.1.5.-III

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов	Дисперсия (средний квадрат отклонений)	F-отношение	Вероятность
Непараллельность	1	1 453,5	1453,5	1,064	0,311
Дни×препарат	1	31,6	31,6	0,023	0,880
Дни×регрессия	1	50,8	50,8	0,037	0,849
Остаточная вариация между группами кроликов	28	38 258,8	1 366,4		
Кролики	31	39 794,7	1 283,7		
Препараты	1	0,14	0,14	0,001	0,975
Регрессия	1	8 859,5	8 859,5	64,532	0,000
Дни	1	478,5	478,5	3,485	0,072
Дни×непараллельность	1	446,3	446,3	3,251	0,082
Остаточная вариация внутри групп кроликов	28	3 844,1	137,3		
Общая вариация	63	53 423,2			

Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты: общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{32 \times (-16,53 - 7)}{\ln 2 \times 16 \times 2} = -33,95;$$

– натуральный логарифм отношения активностей:

$$M'_T = \frac{169,13 - 169,31}{2 \times (-33,95)} = 0,00276;$$

$$C = \frac{8859,5}{8859,5 - 137,3 \times 2,048^2} = 1,0695;$$

$$V = \frac{8859,5}{(-33,95)^2 \times 2 \times 16} = 0,2402;$$

– натуральный логарифм доверительного интервала:

$$1,0695 \times 0,00276 \pm \sqrt{0,0695 \times (1,0695 \times 0,00276^2 + 2 \times 0,2402)} = 0,00295 \pm 0,18279$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 1,003 при 95 % доверительном интервале от 0,835 до 1,204.

Умножив на $A_T = 40$, получим активность 40,1 единиц на миллилитр при 95 % доверительном интервале от 33,4 до 48,2 единиц на миллилитр.

5.2. МОДЕЛЬ УГЛОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ

5.2.1 СХЕМА ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ (0,3,3)

Количественное определение активности фактора VIII.

В лаборатории выполняют количественное определение активности фактора VIII в концентратах по образованию окрашенного продукта. Предположим, что лаборатория не имеет опыта в проведении количественного определения подобного рода, но тем не менее попыталась выполнить эту методику. Готовят по три эквивалентных разведения для стандартного и испытуемого препаратов. Дополнительно готовят препарат «плацебо», хотя и не ожидается наличия линейной зависимости эффекта от дозы в области малых доз. Число повторений для каждого из разведений равно восьми, что в несколько больше, чем требуется при выполнении повседневных количественных определений.

Таблица 5.2.1.-I

Показатели оптической плотности

Концентрация	Плацебо	Стандартный препарат S (в МЕ/мл)			Испытуемый препарат T (в МЕ/мл)		
	B	S_1 0,01	S_2 0,02	S_3 0,03	T_1 0,01	T_2 0,02	T_3 0,03
	0,022	0,133	0,215	0,299	0,120	0,188	0,254
	0,024	0,133	0,215	0,299	0,119	0,188	0,253
	0,024	0,131	0,216	0,299	0,118	0,190	0,255
	0,026	0,136	0,218	0,297	0,120	0,190	0,258
	0,023	0,137	0,220	0,297	0,120	0,190	0,257
	0,022	0,136	0,220	0,305	0,121	0,191	0,257
	0,022	0,138	0,219	0,299	0,121	0,191	0,255
	0,023	0,137	0,218	0,302	0,121	0,190	0,254
Среднее	0,0235	0,1351	0,2176	0,2996	0,1200	0,1898	0,2554

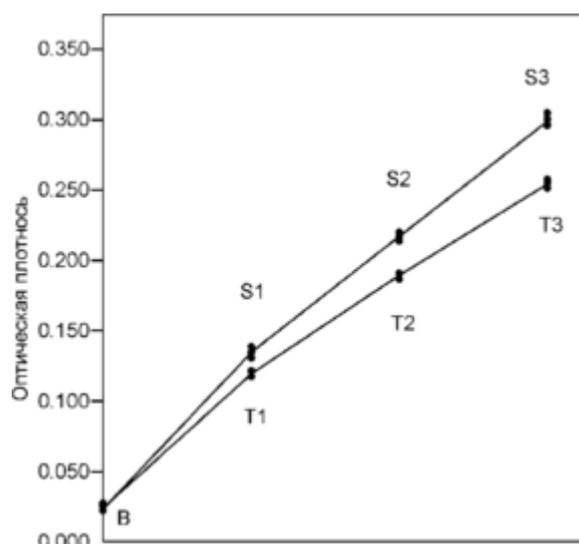


Рисунок 5.2.1.-I.

Графическое представление данных (рис. 5.2.1.-I) показывает, что зависимость результата от дозы действительно нелинейна в области малых доз. На этом основании результаты, полученные при анализе препарата «плацебо», не будут использоваться при расчетах (в дальнейшем для обоснования данного решения, безусловно, нужно будет провести повторные определения с препаратом «плацебо»). Используя формулы, приведенные в таблицах 3.3.3.1.-I и 3.3.3.1.-II, получаем следующие результаты:

$$\begin{aligned}
 P_S &= 0,6524 & P_T &= 0,5651 \\
 L_S &= 1,4693 & L_T &= 1,2656 \\
 a_S &= 0,318 & a_t &= 0,318 \\
 b_S &= 0,329 & b_T &= 0,271 \\
 G_S &= 0,1554 & G_T &= 0,1156 \\
 J_S &= 4,17 \times 10^{-8} & J_T &= 2,84 \times 10^{-6}
 \end{aligned}$$

и

$$H_I = 0,09524 \qquad a' = 0,05298 \qquad K = 1,9764$$

Далее выполняют дисперсионный анализ по формулам, приведенным в таблицах 3.3.3.1.-III и 3.3.3.1.-IV.

Таблица 5.2.1.-II

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Линейная регрессия	2	0,1917	0,0958	24 850	0,000
Точки пересечения	1	$3 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$7 \cdot 10^{-4}$	0,978
Нелинейность	2	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	2,984	0,061
Группы	5	0,1917			
Остаточная вариация	42	$1,62 \cdot 10^{-4}$	$3,86 \cdot 10^{-6}$		
Общая вариация	47	0,1919			

Высокая статистическая значимость регрессии и отсутствие значимых отклонений от линейности и точки пересечения с осью ординат показывают достоверность данных и дают основание для расчета активности.

Угловой коэффициент стандартного препарата:

$$b'_S = \frac{6 \times 1,469 - 36 \times 0,0530}{84} = 0,0822$$

Угловой коэффициент испытуемого препарата:

$$b'_T = \frac{6 \times 1,266 - 36 \times 0,0530}{84} = 0,0677$$

По формуле 3.3.5.1.-3 получаем:

$$R = \frac{0,0677}{0,0822} = 0,823$$

$$C = \frac{0,0822^2}{0,0822^2 - 3,86 \cdot 10^{-6} \times 2,018^2 \times 0,0357} = 1,000083$$

$$K' = 0,000083 \times 0,75 = 0,000062$$

а 95 % доверительный интервал равен

$$0,823 \pm \sqrt{0,000083 \times 1,678 + 0,000062 \times (-1,646)} = 0,823 \pm 0,006$$

Таким образом, полученная активность равна 0,823 с 95 % доверительным интервалом от 0,817 до 0,829.

5.2.2. СХЕМА ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ (0,4,4,4)

Количественное определение активности вакцины против гриппа in vitro.

Содержание антигена гемагглютинина (НА) в двух вакцинах против гриппа определяли методом радиальной иммунодиффузии. На этикетках обеих вакцин была указана активность 15 мкг НА в одной дозе, что эквивалентно содержанию 30 мкг НА/мл. Стандартный препарат имел установленную (аттестованную) активность 39 мкг НА/мл.

Исследовали четыре концентрации стандартной и испытуемой вакцин, рассчитанных исходя из предполагаемых и обозначенных на этикетке активностей; в каждом случае число повторений равно двум. После установления равновесия между внутренним и внешним реагентами измерялась площадь кольцевых зон преципитации. Результаты приведены в таблице 5.2.2.-I.

Таблица 5.2.2.-I

Площадь кольцевых зон преципитации (мм²)

Концентрация (мкг/мл)	Стандартный препарат S		Испытуемый препарат T		Испытуемый препарат U	
	I	II	I	II	I	II
7,5	18,0	18,0	15,1	16,8	15,4	15,7
15,0	22,8	24,5	23,1	24,2	20,2	18,6
22,5	30,4	30,4	28,9	27,4	24,2	23,1
30,0	35,7	36,6	34,4	37,8	27,4	27,0

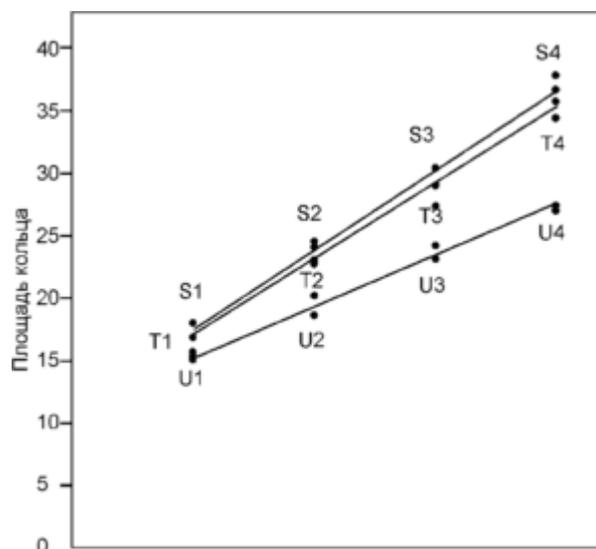


Рисунок 5.2.2.-I

Графическое представление данных не выявило никаких необычных особенностей расположения данных (см. рисунок 5.2.2.-I). Используя формулы, приведенные в таблицах 3.3.3.1-I и 3.3.3.1.-II, получаем следующие результаты:

$$P_S = 108,2$$

$$P_T = 103,85$$

$$P_U = 85,8$$

$$L_S = 301,1$$

$$L_T = 292,1$$

$$L_U = 234,1$$

$$a_S = 141,0$$

$$a_T = 116,7$$

$$a_U = 139,8$$

$$b_S = 61,2$$

$$b_T = 64,95$$

$$b_U = 39,2$$

$$G_S = 3114,3$$

$$G_T = 2909,4$$

$$G_U = 1917,3$$

$$J_S = 0,223$$

$$J_T = 2,227$$

$$J_U = 0,083$$

и

$$H_I = 0,0093$$

$$a' = 11,04$$

$$K = 14\,785,8$$

Далее выполняют дисперсионный анализ по формулам, приведенным в таблицах 3.3.3.1.-III и 3.3.3.1.-IV. Результаты представлены в таблице 5.2.2.-II.

Таблица 5.2.2.-II

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Линейная регрессия	3	1087,7	362,6	339,5	0,000
Точки пересечения	2	3,474	1,737	1,626	0,237
Нелинейность	6	5,066	0,844	0,791	0,594
Группы	11	1096,2			
Остаточная вариация	12	12,815	1,068		
Общая вариация	23	1109,0			

Высокая значимость регрессии и отсутствие значимых отклонений от линейности и точки пересечения свидетельствуют о достоверности полученных результатов и позволяют рассчитать активность.

Угловой коэффициент стандартного препарата:

$$b'_s = \frac{6 \times 301,1 - 60 \times 11,04}{180} = 6,356$$

Угловой коэффициент испытуемой вакцины T;

$$b'_T = \frac{6 \times 292,1 - 60 \times 11,04}{180} = 6,056$$

Угловой коэффициент испытуемой вакцины U;

$$b'_U = \frac{6 \times 234,1 - 60 \times 11,04}{180} = 4,123$$

В результате получаем следующие отношения активностей $6,056 / 6,356 = 0,953$ для вакцины T и $4,123 / 6,356 = 0,649$ для вакцины U.

$$C = \frac{6,356^2}{6,356^2 - 1,068 \times 2,179^2 \times 0,0444} = 1,0056$$

$$K' = 0,0056 \times 0,625 = 0,0035$$

Доверительные интервалы вычисляют по формуле 3.3.5.1.-4.

Для вакцины T:

$$0,955 \pm \sqrt{0,0056 \times 1,913 + 0,0035 \times (-1,913)} = 0,955 \pm 0,063$$

Для вакцины U:

$$0,649 \pm \sqrt{0,0056 \times 1,423 + 0,0035 \times (-1,301)} = 0,649 \pm 0,058$$

Содержание НА в мкг в 1 мл вакцины находят путем умножения отношения активностей и доверительных интервалов на предполагаемое содержание НА 15 мкг/доза. Результаты приведены в таблице 5.2.2.-III.

Таблица 5.2.2.-III

Оценка содержания НА (мкг/доза)

	Нижняя граница	Оценка	Верхняя граница
Вакцина Т	13,4	14,3	15,3
Вакцина U	8,9	9,7	10,6

5.3. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ

5.3.1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОБИТ-АНАЛИЗА ПРИ СРАВНЕНИИ ИСПЫТУЕМОГО ПРЕПАРАТА СО СТАНДАРТНЫМ

Количественное определение активности вакцины против дифтерии in vivo.

Выполняли количественное определение вакцины против дифтерии (предполагаемая активность 140 МЕ/флакон) по отношению к стандартному препарату (установленная активность 132 МЕ/флакон). На основании этих данных готовили эквивалентные дозы и вводили случайным образом группам морских свинок. Через определенный период времени после введения препарата животным вводили дифтерийный токсин, что вызывало гибель животных. Подсчитывали число выживших свинок. Полученные результаты приведены в таблице 5.3.1.-I.

Таблица 5.3.1.-I

Исходные необработанные данные, полученные при количественном определении активности вакцины для профилактики дифтерии методом летальной пробы у морских свинок

Стандартный препарат (S) Установленная активность 132 МЕ/флакон			Испытуемый препарат (T) Предполагаемая активность 140 МЕ/флакон		
Доза (МЕ/мл)	Число зараженных	Число выживших	Доза (МЕ/мл)	Число зараженных	Число выживших
1,0	12	0	1,0	11	0
1,6	12	3	1,6	12	4
2,5	12	6	2,5	11	8
4,0	11	10	4,0	11	10

Затем эти результаты переносили в первую рабочую таблицу, остальные ее столбцы заполняли в соответствии с рекомендациями, приведенными в Разделе 4.2.1. В таблице 5.3.1.-II приведены результаты первого цикла процедуры итерационного анализа.

Таблица 5.3.1.-II

Первая рабочая таблица для первого цикла итерации

Вакцина	Доза	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	ω	ωx	ωy	ωx ²	ωy ²	ωxy
S	1,0	12	0	0,000	0,000	0	0,5	0,399	-1,253	7,64	0,00	-9,57	0,00	12,00	0,00
	1,6	12	3	0,470	0,250	0	0,5	0,399	-0,627	7,64	3,59	-4,79	1,69	3,00	-2,25
	2,5	12	6	0,916	0,500	0	0,5	0,399	0,000	7,64	7,00	0,00	6,41	0,00	0,00
	4,0	11	10	1,386	0,909	0	0,5	0,399	1,025	7,00	9,71	7,18	13,46	7,36	9,95
T	1,0	11	0	0,000	0,000	0	0,5	0,399	-1,253	7,00	0,00	-8,78	0,00	11,00	0,00
	1,6	12	4	0,470	0,333	0	0,5	0,399	-0,418	7,64	3,59	-3,19	1,69	1,33	-1,50

	2,5	11	8	0,916	0,727	0	0,5	0,399	0,570	7,00	6,42	3,99	5,88	2,27	3,66
	4,0	11	10	1,386	0,909	0	0,5	0,399	1,025	7,00	9,71	7,18	13,46	7,36	9,95

Далее суммируют данные последних шести столбцов для каждого из препаратов и результаты заносят во вторую рабочую таблицу (см. таблицу 5.3.1.-III). Остальные столбцы заполняют данными, полученными при использовании формул 4.2.1.-4–4.2.1.-10. В результате получают значение общего углового коэффициента b , равное 1,655.

Таблица 5.3.1.-III

Вторая рабочая таблица для первого цикла итерации

Вакцина	$\Sigma\omega$	$\Sigma\omega x$	$\Sigma\omega y$	$\Sigma\omega x^2$	$\Sigma\omega y^2$	$\Sigma\omega xy$	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	\bar{x}	\bar{y}	a
S	29,92	20,30	-7,18	21,56	22,36	7,70	7,79	12,58	20,64	0,68	-0,24	-1,36
T	28,65	19,72	-0,80	21,03	21,97	12,11	7,46	12,66	21,95	0,69	-0,03	-1,17

Далее значения Y первой рабочей таблицы заменяют значениями $a + bx$ и выполняют второй цикл (см. таблицу 5.3.1.-IV).

Таблица 5.3.1.-IV

Первая рабочая таблица для второго цикла итерации

Вакцина	Доза	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	ω	ωx	ωy	ωx^2	ωy^2	ωxy
S	1,0	12	0	0,000	0,000	-1,36	0,086	0,158	-1,911	3,77	0,00	-7,21	0,00	13,79	0,00
	1,6	12	3	0,470	0,250	-0,58	0,279	0,336	-0,672	6,74	3,17	-4,53	1,49	3,04	-2,13
	2,5	12	6	0,916	0,500	0,15	0,561	0,394	-0,001	7,57	6,94	-0,01	6,36	0,00	-0,01
	4,0	11	10	1,386	0,909	0,93	0,824	0,258	1,260	5,07	7,03	6,39	9,75	8,05	8,86
T	1,0	11	0	0,000	0,000	-1,17	0,122	0,202	-1,769	4,20	0,00	-7,43	0,00	13,14	0,00
	1,6	12	4	0,470	0,333	-0,39	0,349	0,370	-0,430	7,23	3,40	-3,11	1,60	1,34	-1,46
	2,5	11	8	0,916	0,727	0,35	0,637	0,375	0,591	6,70	6,14	3,96	5,62	2,34	3,63
	4,0	11	10	1,386	0,909	1,13	0,870	0,211	1,311	4,35	6,03	5,70	8,36	7,48	7,90

Циклы повторяют до тех пор, пока разница между результатами двух последовательных циклов не станет достаточно маленькой. В результате получают вторую рабочую таблицу 5.3.1.-V.

Таблица 5.3.1.-V

Вторая рабочая таблица после достаточного количества циклов итерации

Вакцина	$\Sigma\omega$	$\Sigma\omega x$	$\Sigma\omega y$	$\Sigma\omega x^2$	$\Sigma\omega y^2$	$\Sigma\omega xy$	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	\bar{x}	\bar{y}	a
S	18,37	14,80	-2,14	14,85	17,81	5,28	2,93	7,00	17,56	0,81	-0,12	-2,05
T	17,96	12,64	-0,55	11,86	18,35	6,76	2,96	7,15	18,34	0,70	-0,03	-1,72

Проверку линейности проводят, как описано в Разделе 4.2.2. Значение χ^2 для 4 степеней свободы равно $0,851 + 1,070 = 1,921$, чему соответствует значение $p = 0,750$, которое не является статистически значимым.

Поскольку отклонение от линейности не является статистически значимым, проверку отклонения от параллельности можно выполнить, как описано в том же разделе. Значение

$$(16,71+17,27) - \frac{14,15^2}{5,89} = 0,001$$

χ^2 для 1 степени свободы равно , чему соответствует значение $p = 0,974$, которое также не является статистически значимым.

Теперь натуральный логарифм отношения активностей может быть рассчитан, как описано в Разделе 4.2.3.

$$(16,71+17,27) - \frac{14,15^2}{5,89} = 0,001$$

Далее:

$$C = \frac{2,401^2 \times 5,893}{2,401^2 \times 5,893 - 1^2 \times 1,960^2} = 1,127$$

$$V = \frac{1}{18,37} + \frac{1}{17,96} = 0,110$$

Натуральный логарифм доверительного интервала:

$$0,155 - 0,013 \pm \sqrt{0,127(0,649 + 1,127 \times 0,036^2)} = 0,142 \pm 0,288$$

Вычислив антилогарифм и умножив полученное значение на предполагаемую активность 40 МЕ/флакон, получим оценку активности 160,6 МЕ/флакон и 95 % доверительный интервал от 121,0 до 215,2 МЕ/флакон.

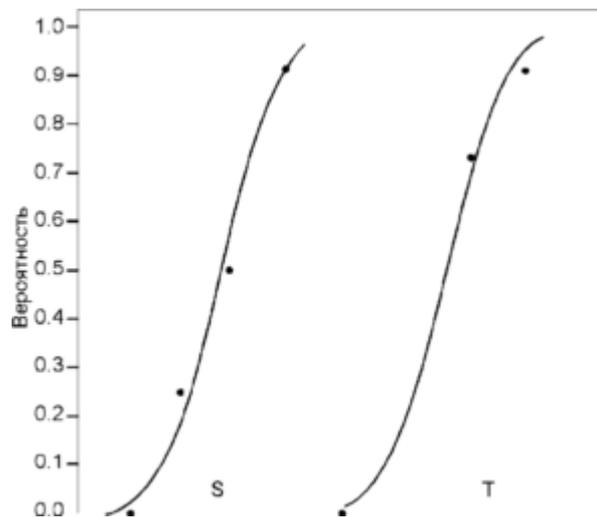


Рисунок 5.3.1.-I.

5.3.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЛОГИТ-АНАЛИЗА И ДРУГИХ АНАЛОГИЧНЫХ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИ СРАВНЕНИИ ИСПЫТУЕМОГО ПРЕПАРАТА СО СТАНДАРТНЫМ ПРЕПАРАТОМ

В данном разделе описаны результаты обработки данных, представленных в разделе 5.3.1 методом логит-анализа и другими «классическими» методами данного типа. В данной конкретной ситуации приведенный материал следует рассматривать как пример, а не в качестве альтернативы методу пробит-анализа. Другая форма кривой может быть принята только в том случае, если необходимость замены подтверждается экспериментальными данными или теоретическими расчетами (см. таблицу 5.3.2.-I).

Таблица 5.3.2.-I

Результаты, полученные при использовании альтернативных методов анализа

	Логит	Гомпит	Угловой ^(*)
Φ	$\frac{1}{1+e^{-Y}}$	$1-e^{-e^Y}$	$\frac{1}{2} \sin Y + \frac{1}{2}$

Z	$\frac{e^{-r}}{(1+e^{-r})^2}$	e^{r-e^2}	$\frac{1}{2} \cos Y$
Угловой коэффициент <i>b</i>	4,101	2,590	1,717
χ^2 (линейность)	2,15	3,56	1,50
χ^2 (параллельность)	0,0066	0,168	0,0010
Активность	162,9	158,3	155,8
Нижняя граница	121,1	118,7	122,6
Верхняя граница	221,1	213,3	200,7

$$(*) \begin{cases} \Phi = 0 & \text{и} & Z = 0, & \text{при } Y < -\frac{1}{2}\pi \\ \Phi = 1 & \text{и} & Z = 0, & \text{при } Y > \frac{1}{2}\pi \end{cases}$$

5.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕД₅₀ ВЕЩЕСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОБИТ-АНАЛИЗА

Количественное определение *in vitro* активности вакцины против полиомиелита, применяемой орально.

Для количественного определения ЕД₅₀ вакцины против полиомиелита было исследовано 10 различных разведений 50 мкл исходной вакцины на ИФА-планшетах по 8 повторений в каждом случае. Полученные результаты приведены в таблице 5.3.3.-I.

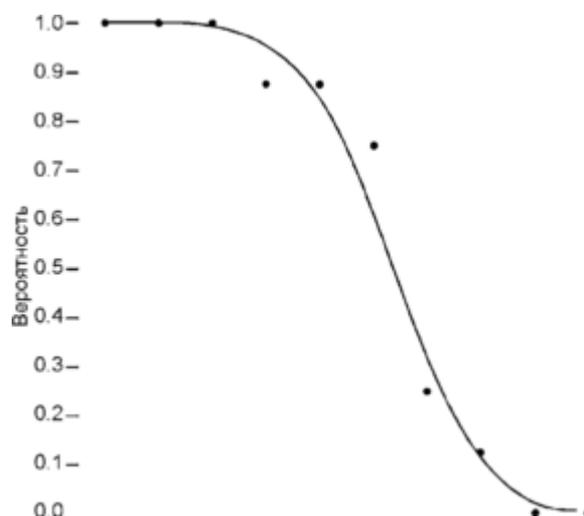


Рисунок 5.3.3.-I.

Таблица 5.3.3.-I

Разведения (10^x мкл исходной вакцины)

-3,5	-4,0	-4,5	-5,0	-5,5	-6,0	-6,5	-7,0	-7,5	-8,0
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
+	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Полученные результаты заносят в первую рабочую таблицу, а остальные ее столбцы заполняют, как описано в Разделе 4.2.1. В таблице 5.3.3.-II приведены результаты первого цикла процедуры итерации, описанной в данном разделе.

Таблица 5.3.3.-II

Первая рабочая таблица для первого цикла

Вакцина	Доза	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>x</i>	<i>p</i>	<i>Y</i>	Φ	<i>Z</i>	<i>y</i>	ω	ωx	ωy	ωx^2	ωy^2	ωxy
<i>T</i>	$10^{-3,5}$	8	0	-8,06	0,000	0,00	0,5	0,399	-1,253	5,09	-41,04	-6,38	330,8	8,00	51,4
	$10^{-4,0}$	8	0	-9,21	0,000	0,00	0,5	0,399	-1,253	5,09	-46,91	-6,38	432,0	8,00	58,8
	$10^{-4,5}$	8	1	-10,36	0,125	0,00	0,5	0,399	-0,940	5,09	-52,77	-4,79	546,8	4,50	49,6
	$10^{-5,0}$	8	2	-11,51	0,250	0,00	0,5	0,399	-0,627	5,09	-58,63	-3,19	675,1	2,00	36,7
	$10^{-5,5}$	8	6	-12,66	0,750	0,00	0,5	0,399	0,627	5,09	-64,50	3,19	816,8	2,00	-40,4
	$10^{-6,0}$	8	7	-13,82	0,875	0,00	0,5	0,399	0,940	5,09	-70,36	4,79	972,1	4,50	-66,1
	$10^{-6,5}$	8	7	-14,97	0,875	0,00	0,5	0,399	0,940	5,09	-76,23	4,79	1140,8	4,50	-71,7
	$10^{-7,0}$	8	8	-16,12	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	-82,09	6,38	1323,1	8,00	-102,9
	$10^{-7,5}$	8	8	-17,27	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	-87,95	6,38	1518,9	8,00	-110,2
	$10^{-8,0}$	8	8	-18,42	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	-93,82	6,38	1728,2	8,00	-117,6

Затем данные последних 6 столбцов суммируют для каждого из препаратов и результаты заносят во вторую рабочую таблицу (см. таблицу 5.3.3.-III). Остальные столбцы заполняют данными, рассчитанными по формулам 4.2.1.-4–4.2.1.-10. В результате получают общий угловой коэффициент *b*, равный -0,295.

Таблица 5.3.3.-III

Вторая рабочая таблица для первого цикла

Вакцина	$\Sigma \omega$	$\Sigma \omega x$	$\Sigma \omega y$	$\Sigma \omega x^2$	$\Sigma \omega y^2$	$\Sigma \omega xy$	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	\bar{x}	\bar{y}	<i>a</i>
<i>T</i>	50,93	-674,3	11,17	9484,6	57,50	-312,32	556,92	-164,43	55,05	-13,24	0,219	-3,690

Далее значения *Y* первой рабочей таблицы заменяют на значения $a + bx$ и выполняют второй цикл итерации. Циклы повторяют до тех пор, пока разница между результатами двух последовательных циклов не станет достаточно малой. В результате получают вторую рабочую таблицу 5.3.3.-IV.

Таблица 5.3.3.-IV

Вторая рабочая Таблица после проведения достаточного числа циклов

Вакцина	S_{ω}	$S_{\omega x}$	$S_{\omega y}$	$S_{\omega x^2}$	$S_{\omega y^2}$	$S_{\omega xy}$	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>a</i>
<i>T</i>	19,39	-238,2	0,11	2981,1	26,05	-37,45	55,88	-36,11	26,05	-12,28	0,006	-7,931

Проверку линейности проводят, как описано в разделе 4.2.2. Значение χ^2 для 8 степеней свободы равно 2,711, чему соответствует значение $p = 0,951$, которое не является статистически значимым.

Теперь оценка отношения активностей может быть получена, как описано в разделе 4.5.

$$M'_T = \frac{-(-7,931)}{-0,646} = -12,273$$

Далее:

$$C = \frac{(-0,646)^2 \times 55,883}{(-0,646)^2 \times 55,883 - 1^2 \times 1,960^2} = 1,197$$

$$V = \frac{1}{19,39} = 0,052$$

Натуральный логарифм доверительного интервала:

$$-14,692 - (-2,420) \pm \sqrt{0,197 \times (2,882 + 1,197 \times 0,009^2)} = -12,272 \pm 0,754$$

Эта оценка все еще выражена в виде натурального логарифма разведений. Для того,

чтобы выразить активность в $\ln(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$, результаты преобразуют в $-M'_T + \ln\left(\frac{1000}{50}\right)$. Поскольку активность такого типа вакцин обычно выражают с использованием десятичного логарифма $\log_{10}(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$, полученный результат следует разделить на $\ln(10)$. В результате получим оценку активности 6,36 $\log_{10}(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$ при 95 % доверительном интервале 6,30–6,96 $\log_{10}(\text{ЕД}_{50})/\text{мл}$.

5.4. РАСШИРЕННЫЕ КРИВЫЕ СИГМОИДНОЙ ЗАВИСИМОСТИ «ДОЗА-ЭФФЕКТ»

5.4.1. АНАЛИЗ ЧЕТЫРЕХПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ КРИВОЙ

Серологическое количественное определение противостолбнячной сыворотки.

Как уже было указано в Разделе 3.4, этот пример представлен только в качестве упражнения для «возможного» способа анализа полученных данных, но не как «единственный» или «наиболее приемлемый» способ. Литературные источники предлагают много иных подходов и они в большинстве случаев не приводят к неприемлемой разнице в конечных результатах. Короткое обсуждение альтернативных способов анализа данных и других статистических решений приведены в Разделе 7.5.

С помощью твердофазного иммуоферментного анализа (*ELISA*) проведено количественное определение антисыворотки, полученной от морских свинок, в сравнении со стандартной сывороткой (0,4 МЕ/мл). Для каждой сыворотки готовили десять двукратных разведений и вносили в лунки 96-луночного ИФА-планшета. Число повторностей для каждого разведения равно 2. Наблюдаемый эффект представлен в таблице 5.4.1.-I.

Таблица 5.4.1.-I

Наблюдаемые эффекты

Стандартный препарат (S)			Испытуемый препарат (T)		
Разведение	1	2	Разведение	1	2
1/10	2,912	2,917	1/10	3,017	2,987
1/20	2,579	2,654	1/20	2,801	2,808
1/40	2,130	2,212	1/40	2,401	2,450
1/80	1,651	1,638	1/80	1,918	1,963
1/160	1,073	0,973	1/160	1,364	1,299
1/320	0,585	0,666	1/320	0,861	0,854
1/640	0,463	0,356	1/640	0,497	0,496
1/1280	0,266	0,234	1/1280	0,340	0,344
1/2560	0,228	0,197	1/2560	0,242	0,217
1/5120	0,176	0,215	1/5120	0,178	0,125

Данный пример приводится с таким допущением, что лаборатория, в которой проводится исследование, имеет документальное подтверждение выполнения условий 1–3 (см. Раздел 3.1.1), полученное в ходе разработки методики для проведения повседневного (рутинного) выполнения. Кроме того, лаборатория также должна иметь документальное подтверждение того, что верхние и нижние пределы при оценке активности испытуемого препарата совпадают с пределами стандартного препарата.

Графическое представление результатов не выявило каких-либо необычных закономерностей расположения данных. Для приведения полученных данных в соответствие логистической функции применяли подходящую компьютерную программу, используя гипотезу о том, что остаточная погрешность является независимой и ее распределение является нормальным случайным распределением. В таком случае три

параметра (α , β и δ) должны быть описаны с применением общего углового коэффициента и общих верхней и нижней асимптот. Для описания горизонтального расположения двух кривых требуется два дополнительных параметра (γ_S и γ_T).

Далее представлены параметры, полученные с помощью упомянутой компьютерной программы:

$$\alpha = 3,196 \qquad \gamma_S = -4,307$$

$$\beta = 1,125 \qquad \gamma_T = -4,684$$

$$\delta = 0,145$$

Кроме того, остаточная вариация (s^2) равна 0,001429 при 20 степенях свободы (внутригрупповая вариация). Для расчета доверительного интервала, а также для проверки на параллельность и линейность наблюдаемые эффекты (u) были подвергнуты линейному преобразованию и затем введены в компьютер для анализа методом взвешенных параллельных линий. Эта методика очень похожа на методику пробит-анализа, которая приведена в разделе 4.2, со следующими изменениями:

$$Y = \beta(x - \gamma)$$

$$y = Y + \frac{\left(\frac{u - \delta}{\alpha - \delta}\right) - \Phi}{Z}$$

$$\Phi = \frac{1}{1 + e^{-r}}$$

$$w = \frac{Z^2 \cdot (\alpha - \delta)^2}{s^2}$$

$$Z = \frac{e^{-r}}{(1 + e^{-r})^2}$$

Результаты взвешенного дисперсионного анализа эффектов (y), преобразованных с учетом их веса (w), приведены в таблице 5.4.1.-II.

Таблица 5.4.1.-II

Взвешенный дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	χ^2	Вероятность
Препараты	1	0,529 653	0,467
Линейная регрессия	1	6 599,51	0,000
Непараллельность	1	0,045 873 8	0,830
Нелинейность	16	8,893 37	0,918
Уровни воздействия (группы)	19	6 608,98	0,000
Остаточная вариация	20	20,000 0	
Общая вариация	39	6628,98	

Отсутствие значимых статистических отклонений от параллельности и линейности подтверждает, что результаты количественного определения пригодны для расчета активности. Если условие соответствия верхней и нижней асимптот не было выявлено, не следует ожидать статистически значимых отклонений от линейности и/или параллельности ввиду того, что проверка линейности и параллельности подтверждает пригодность экспериментальных данных предлагаемой модели четырехпараметрической логистической кривой. Остаточная погрешность в данном дисперсионном анализе всегда будет равна 1, как результат произведенных преобразований. Однако можно рассчитать фактор неоднородности (по аналогии с пробит-моделью). Относительная активность испытуемого препарата представляет собой антилогарифм $\gamma_S - \gamma_T$. Умножив рассчитанную активность испытуемого препарата на активность стандартного препарата, получают оценку активности, равную $1,459 \cdot 0,4 = 0,584$ МЕ/мл. Применив формулу 4.2.3.-2, вычисляют 95 % доверительный интервал от 0,557 до 0,612 МЕ/мл.

6. ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

6.1. ВВЕДЕНИЕ

С целью удовлетворения требованиям Фармакопеи часто необходимо повторение нескольких независимых количественных определений и объединение полученных результатов. В связи с этим возникает вопрос: в каких случаях возможно объединение результатов и каким образом это осуществляется.

Два количественных определения могут быть рассмотрены как действительно независимые, если выполнение любого из них не влияет на вероятности появления возможных результатов другого. Это означает, что случайные ошибки всех существенных факторов, которые могут повлиять на результат в ходе выполнения одного количественного определения (например, разведения стандартного и испытуемого препаратов, чувствительность биологических индикаторов) не зависят от соответствующих случайных ошибок этих факторов в ходе выполнения другого количественного определения. Таким образом, количественные определения, которые проводятся в последующие дни с использованием одинаковых сохранных разведений стандартного препарата, не являются независимыми.

Существует несколько методов объединения результатов независимых количественных определений, и наиболее приемлемый из них с теоретической точки зрения является довольно сложным при практическом использовании. Ниже описаны три простых метода аппроксимации, однако могут использоваться и другие методы, если выполнены необходимые условия объединения результатов.

Если данные количественного определения основываются на использовании модели параллельных линий или модели пробит-анализа, полученные значения активностей перед объединением необходимо представить в логарифмическом виде; значения активностей, полученные при использовании модели угловых коэффициентов, объединяют без преобразований. Поскольку модель параллельных линий используют чаще, чем модель угловых коэффициентов, в данном разделе в формулах используется символ M , обозначающий натуральный логарифм отношения активностей. Подставляя вместо M отношения угловых коэффициентов R , можно применять те же формулы для определения активностей, найденных при использовании модели угловых коэффициентов. Перед объединением значения активностей всех исследованных препаратов должны быть скорректированы по отношению к установленной активности.

6.2. ВЗВЕШЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Данный метод может быть использован только в том случае, если выполняются следующие условия:

- 1) оценки активностей получены в ходе независимых количественных определений;
- 2) для каждого из количественных определений значение C близко к 1 (другими словами, меньше чем 1,1);
- 3) число степеней свободы конкретных остаточных погрешностей (вариаций) не меньше 6, но желательно, чтобы оно было больше 15;
- 4) значения индивидуальных активностей образуют однородное множество (см. Раздел 6.2.2).

Если эти условия не выполняются, метод взвешенного объединения результатов нельзя использовать. В этом случае для нахождения наилучшей оценки средней активности, которая затем будет применяться в последующих количественных определениях в качестве предполагаемой активности, может использоваться метод, описанный в Разделе 6.3.

6.2.1. РАСЧЕТ ВЕСОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ

Предположим, что проведено n' количественных определений, в ходе которых получено n' значений M с соответствующими доверительными интервалами. Для каждого количественного определения рассчитывается логарифмический доверительный интервал l

путем вычитания нижнего значения из верхнего. Вес W для каждого значения M вычисляется по формуле 6.2.1.-1, где t имеет то же значение, которое используется при расчете доверительных интервалов.

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \quad (6.2.1.-1)$$

6.2.2. ОДНОРОДНОСТЬ ОЦЕНОК АКТИВНОСТИ

Однородность оценок активностей определяют следующим образом. Отклонение каждого из значений M от взвешенного среднего возводят в квадрат, умножают на соответствующий вес и суммируют по всем количественным определениям. В результате получают статистический ряд, приблизительно распределенный как χ^2 (см. таблицу 8.3), который может использоваться для оценки однородности множества натуральных логарифмов оценок активностей:

$$\chi^2 \approx \sum_n W(M - \bar{M})^2, \quad \bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \quad (6.2.2.-1)$$

Если рассчитанное значение χ^2 меньше табличного значения, соответствующего ($n'-1$) степеней свободы, то активности однородны, и среднее значение активности, а также доверительные интервалы, рассчитанные при помощи метода, описанного в Разделе 6.2.3, будут обоснованными.

Если рассчитанное значение статистического ряда больше табличного, активности неоднородны. Это означает, что отклонение между индивидуальными оценками M больше, чем можно было бы ожидать исходя из оценок границ доверительных интервалов, то есть между количественными определениями существует значительная вариабельность. В этом случае условие 4 не выполняется и формулы, приведенные в Разделе 6.2.3, неприменимы. Вместо них могут быть использованы формулы, приведенные в Разделе 6.2.4.

6.2.3. РАСЧЕТ ВЗВЕШЕННОГО СРЕДНЕГО И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ

Для каждого количественного определения рассчитывают значения WM , а их сумму делят на суммарный вес всех количественных определений. В результате получают значение логарифма взвешенной средней активности:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \quad (6.2.3.-1)$$

Стандартная ошибка натурального логарифма средней активности вычисляется как квадратный корень из величины, обратной суммарному весу:

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}}, \quad (6.2.3.-2)$$

а приблизительные границы доверительного интервала равны антилогарифмам значений, полученным по формуле

$$\bar{M} \pm ts_{\bar{M}}, \quad (6.2.3.-3)$$

где число степеней свободы t равно сумме чисел степеней свободы средних квадратов ошибок отдельных количественных определений.

6.2.4. ВЗВЕШЕННОЕ СРЕДНЕЕ И ГРАНИЦЫ ДОВЕРИТЕЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА, ОСНОВАННЫЕ НА ДИСПЕРСИИ МЕЖДУ ИСПЫТАНИЯМИ И ВНУТРИ НИХ

При объединении результатов нескольких повторных количественных определений величина χ^2 может быть статистически значимой. В этом случае полученная вариация имеет две компоненты:

- вариация в пределах одной серии количественных определений $s_M^2 = 1/W$;
- вариация между различными сериями количественных определений

$$s_{\bar{M}}^2 = \frac{\sum (M - \bar{M})^2}{n'(n'-1)},$$

где M – невзвешенное среднее значение.

Первый компонент вариации изменяется от одного количественного определения до другого, тогда как второй компонент является общим для всех M .

Тогда для каждого значения M рассчитывают весовой коэффициент W' , который заменяет значение W в Разделе 6.2.3; при этом t приблизительно равно 2.

$$W' = \frac{1}{s_M^2 + s_{\bar{M}}^2}$$

6.3. НЕВЗВЕШЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Наиболее простым способом объединения n' оценок для значений M при n' количественных определениях является вычисление среднего значения и оценка стандартного отклонения по формуле:

$$s_{\bar{M}}^2 = \frac{\sum (M - \bar{M})^2}{n'(n'-1)}, \tag{6.3.-1}$$

а границы доверительного интервала:

$$\bar{M} \pm t s_{\bar{M}}, \tag{6.3.-2}$$

где t имеет $(n'-1)$ степеней свободы. Число n' оценок значений M обычно мало, а значение t , соответственно, довольно велико.

6.4. ПРИМЕР ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЗВЕШЕННОЙ СРЕДНЕЙ АКТИВНОСТИ С ДОВЕРИТЕЛЬНЫМ ИНТЕРВАЛОМ

В таблице 6.4.-I приведено шесть независимых оценок активности одного и того же препарата, а также их 95 % доверительные интервалы и число степеней свободы для их дисперсий ошибки. Условия 1, 2 и 3, приведенные в Разделе 6.2, выполнены. Натуральный логарифм активностей и веса рассчитаны, как описано в Разделе 6.2.

Таблица 6.4.-I

Оценки активностей и доверительные интервалы 6 независимых количественных определений

Оценка активности (МЕ/флакон)	Нижняя граница (МЕ/флакон)	Верхняя граница (МЕ/флакон)	Степени свободы	\ln активности M	Вес W
18 367	17 755	19 002	20	9,8183	3777,7
18 003	17 415	18 610	20	9,7983	3951,5

18 064	17 319	18 838	20	9,8017	2462,5
17 832	17 253	18 429	20	9,7887	4003,0
18 635	17 959	19 339	20	9,8328	3175,6
18 269	17 722	18 834	20	9,8130	4699,5

Однородность оценок активностей рассчитывают по формуле 6.2.2.-1, в результате получают значение χ^2 , равное 4,42 при 5 степенях свободы. Этот результат не является статистически значимым ($p = 0,49$) и, следовательно, все условия для применения оценки взвешенной средней активности выполняются.

Взвешенную среднюю активность вычисляют по формуле 6.2.3.-2, в результате получают значение 9,8085.

По формуле 6.2.3.-2 рассчитывают стандартное отклонение, равное 0,006 73, а по формуле 6.2.3.-3 вычисляют 95 % доверительный интервал 9,7951–9,8218, где t имеет 120 степеней свободы.

Взяв антилогарифм, получают значение активности, равное 18 187 МЕ/флакон при 95 % доверительном интервале от 17 946 до 18 431 МЕ/флакон.

7. ДОПОЛНЕНИЕ

Невозможно дать исчерпывающий обзор статистических методов, используемых при проведении фармакопейных исследований. Тем не менее методы, изложенные в данном разделе, удовлетворяют требованиям большинства фармакопейных целей. В данном разделе сделана попытка представить в большей степени краткий обзор альтернативных или наиболее общих методов статистического анализа. Заинтересованные лица могут также обратиться к специальной литературе по этой теме. В случае использования более специализированных методов статистического анализа следует обратиться за помощью к квалифицированным специалистам.

7.1. ОБЩИЕ ЛИНЕЙНЫЕ МОДЕЛИ

Методы, изложенные в данном разделе, могут быть описаны в рамках общих линейных моделей (или обобщенных линейных моделей для того, чтобы включить методы пробит и логит-анализа). Принцип всех методов основан на построении линейной матрицы структуры X (или матрицы плана), в которой каждая строка представляет результаты наблюдения, а каждый столбец – один из линейных факторов (препарат, блок, столбец, дозу). Например, в случае схемы латинского квадрата, рассмотренной в Разделе 5.1.2, такая матрица состояла бы из 36 строк и 13 столбцов – по одному столбцу на каждый из препаратов, один столбец для доз, пять столбцов на каждый из блоков, за исключением первого, и пять столбцов для каждой строки, за исключением первой. Все столбцы, за исключением одного для доз, заполняют 0 или 1 в зависимости от того, связано данное наблюдение с данным фактором или нет. Вектор Y заполняют результатами наблюдений (преобразованными). Искомые параметры вычисляют по формуле $(X'X)^{-1}X'Y$, после чего оценка активности m может быть легко получена как отношение соответствующих параметров. Доверительные интервалы рассчитываются на основе теоремы Филлера (*Fieller*):

$$m_L, m_U = \frac{\left[m - \frac{g v_{12}}{v_{22}} \pm \frac{ts}{b} \sqrt{v_{11} - 2m v_{12} + m^2 v_{22} - g \left(v_{11} - \frac{v_{12}^2}{v_{22}} \right)} \right]}{(1-g)}$$

где:
$$g = \frac{t^2 s^2 v_{22}}{b^2}$$

а v_{11} , v_{22} – множители дисперсии знаменателя и числителя, соответственно; v_{12} – множитель ковариации. Эти множители можно непосредственно вычислить из матрицы $(X'X)^{-1}$ или косвенным методом, приняв во внимание, что

$$\text{Var}(a_1 - a_2) = \text{Var}(a_1) + \text{Var}(a_2) - 2\text{Cov}(a_1, a_2),$$

$$\text{Cov}(a_1 - a_2, b) = \text{Cov}(a_1, b) - \text{Cov}(a_2, b).$$

Полный дисперсионный анализ с полным разделением компонентов несколько более сложен, поскольку он предполагает пересмотр матрицы X , которая дополняется столбцами для ослабления предположений о параллельности и линейности, после чего может быть проверена гипотеза о линейности. В случае количественных определений, основанных на альтернативных эффектах, факторы линейности (точки пересечения кривых с осью ординат a_s , a_T и т.д. общий угловой коэффициент b) находят путем максимизации суммы по группам воздействий препаратов (дозы) $n \ln \Phi(a_i + bx) + (n - r) \ln(1 - \Phi(a_i + bx))$, где x – натуральный логарифм дозы ($\ln(\text{доза})$), Φ – определяет форму распределения, $i \in \{S, T, \dots\}$.

7.2. НЕОДНОРОДНОСТЬ ДИСПЕРСИИ

Проблема неоднородности дисперсии не всегда может быть решена путем простого преобразования эффектов. В этом случае один из возможных способов решения данной проблемы состоит в применении метода взвешенной линейной регрессии. Чтобы получить объективную оценку, веса результатов наблюдений берутся как величины, обратно пропорциональные дисперсии ошибок. Так как истинное значение дисперсии ошибок не всегда известно, веса могут подбираться с использованием линейной интерактивной процедуры. Однако при расчете доверительных интервалов при этом возникают дополнительные проблемы.

7.3. РЕЗКО ВЫДЕЛЯЮЩИЕСЯ ЗНАЧЕНИЯ (ВЫБРОСЫ) И УСТОЙЧИВОСТЬ МЕТОДОВ В РАБОТЕ (РОБАСТНОСТЬ)

Недостатком метода наименьших квадратов, описанного в данном разделе, является его довольно высокая чувствительность к резко отклоняющимся от среднего значения данным. Очевидный выброс может целиком исказить результаты вычислений. Эту проблему часто решают путем исключения таких выбросов из набора данных. Такой подход может привести к субъективному исключению данных – не всегда корректному и безопасному. Довольно сложно дать общие рекомендации, касающиеся решения относительно того, является ли конкретный результат наблюдения резко выделяющимся выбросом или нет, и с этим связано появление и развитие ряда робастных (устойчивых в работе) методов анализа. Эти методы менее чувствительны к выбросам за счет того, что результатам, которые в большей мере отличаются от прогнозируемого значения, придается меньший вес. В данном случае возникает ряд новых проблем, связанных с расчетом доверительных интервалов, а также с определением подходящей функции для минимизации ошибок.

7.4. ОШИБКИ КОРРЕЛЯЦИИ

С практической точки зрения полная рандомизация не всегда бывает осуществима или крайне нежелательна. Поэтому для последовательных доз в пределах серии разведений часто характерны ошибки корреляции, которые приводят к чрезмерному сужению доверительных интервалов. Существует несколько методов, которые позволяют оценить такой эффект «автокорреляции».

7.5. РАСШИРЕННЫЕ НЕЛИНЕЙНЫЕ КРИВЫЕ ЗАВИСИМОСТИ «ДОЗА-ЭФФЕКТ»

Статистический анализ расширенных нелинейных кривых зависимости «доза-эффект» приводит к возникновению специфических трудностей, для решения которых необходим совет специалиста по биостатистике. Некоторые из таких трудностей перечислены ниже.

1) Ранее приведен пример анализа с применением четырехпараметрической логистической функции. Однако для этого случая применимы и модели, которые подчиняются другим функциям, имеющим график сигмоидной формы. Может быть рекомендована, например, модель, включающая дополнительные параметры асимметрии.

2) Неоднородность дисперсии характерна для случая, когда эффект распределяется в широком диапазоне значений. В том случае, если при статистическом анализе неоднородность будет проигнорирована, полученная оценка интерпретированных результатов может быть неправильной и отягощенной предвзятостью. Использование взвешенных обратных величин ошибки дисперсии не может быть применено для случая ограниченного числа повторностей в испытании. Для такого случая лучше будет применение функции, описывающей зависимость дисперсии от среднего значения эффекта.

3) Процедура приведения графика зависимости к соответствию статистической модели дает различные оценки, в зависимости от применяемых предположений относительно дисперсии и диапазона значений эффекта.

4) В принципе эквивалентность нижнего и верхнего пределов эффекта для различных препаратов при количественном определении может быть проверена непосредственно в ходе количественного определения каждой серии. Однако интерпретация результатов этих определений может быть не прямой. Так, например, проверка линейности и параллельности, предпринятая по упрощенной методике анализа (см. пример 5.4.1), включает косвенную оценку эквивалентности и правильности нижнего и верхнего пределов эффекта.

5) Многие методы количественного определения предполагают применение «контрольного опыта», результаты которого предназначаются для определения верхнего и/или нижнего пределов эффекта. Однако значения этих границ могут быть несопоставимы со значениями пределов, определенных в ходе применения статистических моделей, основанных на расширенных нелинейных графиках зависимости «доза-эффект».

6) Упрощенный метод статистического анализа, приведенный, как пример 5.4.1, предусматривает приблизительную оценку доверительного интервала результата. В этом случае могут применяться другие методы, например, метод интервалов с несогласованными значениями для полностью определенной модели. Так, для типичных результатов количественного определения с эффектами, распространяющимися на весь диапазон значений для каждого испытуемого препарата, все методы анализа дают сходные результаты.

7.6. НЕПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ КРИВЫХ ЗАВИСИМОСТИ «ДОЗА-ЭФФЕКТ»

Сходство зависимостей «доза-эффект» является фундаментальным требованием при оценке результатов количественного определения, которые могут рассматриваться как основные на «принципе разведения» и, соответственно, оценка результатов относительной активности которых является достоверной (см. Раздел 3.1.1). Соответствие этому требованию часто определяют по отсутствию статистически значимого различия графически представленных кривых зависимости «доза-эффект» для стандартного и испытуемого препаратов. Недооценка остаточной погрешности (вариации) может привести к избыточному исключению результатов количественного определения из-за статистически значимых отклонений от параллельности и/или линейности. Такие случаи часто представляют собой артефакт при выборе несоответствующего плана исследований или несоответствующего анализа результатов. Небольшие изменения, вносимые в план исследования, в большинстве случаев могут существенно исправить оценку остаточной погрешности. Также в этой ситуации может помочь проведение достаточного числа повторных количественных определений, если это возможно. Если оценка величины соответствующей остаточной погрешности (вариации) не может быть проведена для каждого конкретного количественного определения, например, в том случае, когда это неосуществимо или практически нецелесообразно, может быть проведена более точная оценка остаточной погрешности в ходе валидации методики количественного определения. Также могут встречаться случаи, когда аналитическая система количественного определения обладает необходимой точностью для обнаружения небольших отклонений от непараллельности, обусловленных природой эффекта. Если непараллельность является истинной, тогда следует разработать и применить подходящее решение проблемы. Для решения этой проблемы, например, может потребоваться использование стандартного препарата, по составу соответствующего (соответственно «параллельного») испытуемому препарату. Если же аналитическая система количественного определения дает неспецифический ответ на неопределяемые компоненты стандартного или испытуемого

препаратов, тогда решением проблемы может стать более специфическая аналитическая система, которая не будет реагировать на несущественные компоненты препаратов. Для решения этих фундаментальных проблем не существует простых общеприменимых статистических методов. Подходящие методы могут быть выбраны в каждом конкретном случае, опираясь на помощь специалистов-статистиков.

8. ТАБЛИЦЫ И ПРОЦЕДУРЫ ГЕНЕРИРОВАНИЯ

В данном разделе приведены таблицы, в которых указаны критические значения для наиболее часто встречающихся чисел степеней свободы. Если необходимое значение отсутствует в таблице, следует обратиться к более полным таблицам. Статистические функции включены во многие компьютерные программы, которые могут быть использованы вместо таблиц. В качестве альтернативы могут использоваться приведенные после каждой таблицы процедуры генерирования⁶, которые позволяют рассчитать вероятность, соответствующую заданному статистическому массиву и числу степеней свободы.

⁶ Процедуры генерирования представляют собой программные коды, которые написаны для редактора VBA (*Visual Basic for Application*) и позволяют осуществлять расчеты указанных статистических параметров в прикладных программах типа Excel (*Microsoft Office*). Ряд дополнительных процедур генерирования и управления данными для биологических испытаний и тестов можно найти в руководстве Лапача С. Н. и соавт. (2001).

8.1. F-РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

Если полученное значение превышает приведенное в таблице 8.1.-I, оно рассматривается как значимое (верхние строки, $p = 0,05$) либо как высокозначимое (нижние строки, $p = 0,01$). $df1$ – число степеней свободы числителя, $df2$ – число степеней свободы знаменателя.

Таблица 8.1.-I

Критические значения F-распределения

df1 df2	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20	∞
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,072	2,978	2,913	2,845	2,774	2,538
	10,044	7,559	6,552	5,994	5,636	5,386	5,057	4,849	4,706	4,558	4,405	3,909
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,849	2,753	2,687	2,617	2,544	2,296
	9,330	6,927	5,953	5,412	5,064	4,821	4,499	4,296	4,155	4,010	3,858	3,361
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,641	2,544	2,475	2,403	2,328	2,066
	8,683	6,359	5,417	4,893	4,556	4,318	4,004	3,805	3,666	3,522	3,372	2,868
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,447	2,348	2,278	2,203	2,124	1,843
	8,096	5,849	4,938	4,431	4,103	3,871	3,564	3,368	3,231	3,088	2,938	2,421
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,337	2,236	2,165	2,089	2,007	1,711
	7,770	5,568	4,675	4,177	3,855	3,627	3,324	3,129	2,993	2,850	2,699	2,169
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,266	2,165	2,092	2,015	1,932	1,622
	7,562	5,390	4,510	4,018	3,699	3,473	3,173	2,979	2,843	2,700	2,549	2,006
50	4,034	3,183	2,790	2,557	2,400	2,286	2,130	2,026	1,952	1,871	1,784	1,438
	7,171	5,057	4,199	3,720	3,408	3,186	2,890	2,698	2,563	2,419	2,265	1,683
∞	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	1,938	1,831	1,752	1,666	1,571	1,000
	6,635	4,605	3,782	3,319	3,017	2,802	2,511	2,321	2,185	2,039	1,878	1,000

Процедура генерирования. Пусть F есть F -отношение для $df1$ и $df2$ степеней свободы, как описано выше. Положим $p_i = \pi = 3,14159265358979\dots$ Тогда процедура, описанная в Таблице 8.1.-II, будет генерировать p -значение статистики.

Таблица 8.1.-II

Процедура генерирования для F-распределения

Если df четное	Если $df1$ нечетное, а $df2$ четное	Если $df1$ и $df2$ не четные
------------------	-------------------------------------	------------------------------

$x = df1 / (df1 + df2 / F)$	$x = df2 / (df2 + df1 * F)$	$x = \text{atn}(\text{sqr}(df1 * F / df2))$
$s = 1$	$s = 1$	$cs = \cos(x)$
$t = 1$	$t = 1$	$sn = \sin(x)$
for $i = 2$ to $(df1 - 2)$ step 2	for $i = 2$ to $(df2 - 2)$ step 2	$x = x / 2$
$t = t * x * (df2 + i - 2) / i$	$t = t * x * (df1 + i - 2) / i$	$s = 0$
$s = s + t$	$S = s + t$	$t = sn * cs / 2$
next i	next i	$v = 0$
$p = s * (1 - x)^{(df2 / 2)}$	$p = 1 - s * (1 - x)^{(df1 / 2)}$	$w = 1$
		for $i = 2$ to $(df2 - 1)$ step 2
		$s = s + t$
		$t = t * i / (i + 1) * cs * cs$
		next i
		for $i = 1$ to $(df1 - 2)$ step 2
		$v = v + w$
		$w = w * (df2 + i) / (i + 2) * sn * sn$
		next i
		$p = 1 + (t * df2 * v - x - s) / pi * 4$

8.2. *t*-РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

Если полученное значение превышает значение в таблице 8.2.-I, оно рассматривается как значимое ($p = 0,05$) либо как высокозначимое ($p = 0,01$).

Таблица 8.2.-I

*Критические значения *t*-распределения*

<i>df</i>	$p = 0,05$	$p = 0,01$	<i>df</i>	$p = 0,05$	$p = 0,01$
1	12,706	63,656	22	2,074	2,819
2	4,303	9,925	24	2,064	2,797
3	3,182	5,841	26	2,056	2,779
4	2,776	4,604	28	2,048	2,763
5	2,571	4,032	30	2,042	2,750
6	2,447	3,707	35	2,030	2,724
7	2,365	3,499	40	2,021	2,704
8	2,306	3,355	45	2,014	2,690
9	2,262	3,250	50	2,009	2,678
10	2,228	3,169	60	2,000	2,660
12	2,179	3,055	70	1,994	2,648
14	2,145	2,977	80	1,990	2,639
16	2,120	2,921	90	1,987	2,632
18	2,101	2,878	100	1,984	2,626
20	2,086	2,845	∞	1,960	2,576

Процедуры генерирования. Для заданного значения t при числе степеней свободы df значение p может быть найдено при помощи процедур, описанных в Разделе 8.1, где $F = t^2$, $df1 = 1$, а $df2 = df$.

Для заданного числа степеней свободы df значение t (при $p = 0,05$) может быть найдено с помощью следующей процедуры, приведенной в таблице 8.2.-II (в этом случае следует обеспечить точность до 6-го десятичного знака):

Таблица 8.2.-II

*Процедура генерирования для *t*-распределения*

$$t = 1,959964 + \\ 2,37228/df + \\ 2,82202/df^2 + \\ 2,56449/df^3 + \\ 1,51956/df^4 +$$

1,02579/df⁵ +

0,44210/df⁷

8.3 РАСПРЕДЕЛЕНИЕ χ^2

Если полученное значение превышает значение в таблице 8.3.-I, оно рассматривается как значимое ($p = 0,05$) либо как высокозначимое ($p = 0,01$).

Таблица 8.3.-I

Критические значения распределения χ^2

df	$p = 0,05$	$p = 0,01$	df	$p = 0,05$	$p = 0,01$
1	3,841	6,635	11	19,675	24,725
2	5,991	9,210	12	21,026	26,217
3	7,815	11,345	13	22,362	27,688
4	9,488	13,277	14	23,685	29,141
5	11,070	15,086	15	24,996	30,578
6	12,592	16,812	16	26,296	32,000
7	14,067	18,475	20	31,410	37,566
8	15,507	20,090	25	37,652	44,314
9	16,919	21,666	30	43,773	50,892
10	18,307	23,209	40	55,758	63,691

Процедура генерирования. Обозначим значение χ^2 через x^2 , а df присвоим значение, как это указано выше. Выполнение следующей процедуры, представленной в таблице 8.3.-II, генерирует значение p статистики.

Таблица 8.3.-II

Процедура генерации для распределения χ^2

Если df четное	Если df нечетное
$s = 0$;	$x = \text{sqr}(x^2)$
$t = \exp(-x^2 / 2)$	$s = 0$
for $i = 2$ to df step 2	$t = x * \exp(-x^2 / 2) / \text{sqr}(\pi / 2)$
$s = s + t$	for $i = 3$ to df step 2
$t = t * x^2 / i$	$s = s + t$
next i	$t = t * x^2 / i$
$p = 1 - s$	next i
	$p = 1 - s - 2 * \text{phi}(x)$

В этой процедуре phi является функцией кумулятивного стандартного нормального распределения Φ (см. Раздел 8.4).

8.4. Ф-РАСПРЕДЕЛЕНИЕ (КУМУЛЯТИВНАЯ СТАНДАРТНАЯ ФУНКЦИЯ НОРМАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ)

Для отрицательных x Φ -значение находят из таблицы 8.4.-I как $1 - \Phi(-x)$.

Таблица 8.4.-I

Значения Ф-распределения

x	Φ	x	Φ	x	Φ
0,00	0,500	1,00	0,841	2,00	0,977
0,05	0,520	1,05	0,853	2,05	0,980
0,10	0,540	1,10	0,864	2,10	0,982
0,15	0,560	1,15	0,875	2,15	0,984
0,20	0,579	1,20	0,885	2,20	0,986
0,25	0,599	1,25	0,894	2,25	0,988

0,30	0,618	1,30	0,903	2,30	0,989
0,35	0,637	1,35	0,911	2,35	0,991
0,40	0,655	1,40	0,919	2,40	0,992
0,45	0,674	1,45	0,926	2,45	0,993
0,50	0,691	1,50	0,933	2,50	0,994
0,55	0,709	1,55	0,939	2,55	0,995
0,60	0,726	1,60	0,945	2,60	0,995
0,65	0,742	1,65	0,951	2,65	0,996
0,70	0,758	1,70	0,955	2,70	0,997
0,75	0,773	1,75	0,960	2,75	0,997
0,80	0,788	1,80	0,964	2,80	0,997
0,85	0,802	1,85	0,968	2,85	0,998
0,90	0,816	1,90	0,971	2,90	0,998
0,95	0,829	1,95	0,974	2,95	0,998

Процедура генерирования. Примем значение x равным x . Следующая процедура (см. таблицу 8.4.-II) позволяет получить значения Φ при $0 < x < 8,15$. Если x больше 8,15, Φ -значение можно принять равным 1. Для отрицательных x может быть использована формула, приведенная выше. Данная процедура предполагает, что компьютер может представлять около 15 десятичных знаков. Если число десятичных знаков меньше или больше, в процедуру необходимо внести определенные простые преобразования.

Таблица 8.4.-II

Процедура генерирования для Φ -распределения

```

s = 0
t = x
i = 1
repeat
s = s + t
i = i + 2
t = t * x * x / i
until t < 1E - 16
phi = 0,5 + s * exp(-x * x / 2) / sqrt(2 * pi)

```

8.5. СЛУЧАЙНЫЕ ПЕРЕСТАНОВКИ

Необходимость в случайных перестановках возникает в случае использования схемы рандомизированных блоков. Приведенный ниже алгоритм позволяет получить случайные перестановки N воздействий (доз), используя встроенный в компьютерное обеспечение генератор псевдослучайных чисел:

- 1) записывают N возможных видов воздействия (доз) в ряд;
- 2) генерируют случайное целое число r , чтобы $1 < r < N$;
- 3) меняют местами r -тое и N -тое исследования в ряду;
- 4) уменьшают N на единицу ($N = N - 1$) и повторяют шаги 2–4 до тех пор, пока N не станет равно 1.

Например, случай из 6 видов воздействий (доз) иллюстрирует этот алгоритм.

1.	$N = 6$	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3
2.	$r = 2$		→				←
3.		S_1	T_3	S_3	T_1	T_2	S_2
4.	$N = 5$						
2.	$r = 4$				→	←	
3.		S_1	T_3	S_3	T_2	T_1	S_2
4.	$N = 4$						
2.	$r = 4$				↓		
3.		S_1	T_3	S_3	T_2	T_1	S_2
4.	$N = 3$						
2.	$r = 1$		→		←		
3.		S_3	T_3	S_1	T_2	T_1	S_2

4.	N = 2						
2.	r = 1	→	←				
3.		T ₃	S ₃	S ₁	T ₂	T ₁	S ₂
4.	N = 1						

8.6. ЛАТИНСКИЕ КВАДРАТЫ

Приведенный ниже пример показывает, как можно построить латинский квадрат, используя 3 независимых перестановки.

1. Генерируют случайную перестановку N возможных видов воздействия (доз) (см. раздел 8.5):

T ₃	S ₃	S ₁	T ₂	T ₁	S ₂
----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

2. Используя эту перестановку, можно построить простой латинский квадрат. Для этого перестановку «поворачивают» по часовой стрелке следующим образом. Полученную в ходе выполнения шага 1 перестановку записывают в первой строке. Во вторую строку записывают те же значения, но смещенные на один столбец вправо. При этом крайнее правое значение записывают в левую пустую ячейку. Процедуру повторяют до тех пор, пока каждое исследование не встретится по одному разу в каждом столбце:

T ₃	S ₃	S ₁	T ₂	T ₁	S ₂
S ₂	T ₃	S ₃	S ₁	T ₂	T ₁
T ₁	S ₂	T ₃	S ₃	S ₁	T ₂
T ₂	T ₁	S ₂	T ₃	S ₃	S ₁
S ₁	T ₂	T ₁	S ₂	T ₃	S ₃
S ₃	S ₁	T ₂	T ₁	S ₂	T ₃

3. Генерируют две независимых случайных перестановки натуральных чисел от 1 до N:

– одну для строк:

2	3	6	1	4	5
---	---	---	---	---	---

– и одну для столбцов:

3	4	6	2	5	1
---	---	---	---	---	---

4. Теперь можно построить латинский квадрат, сортируя строки и столбцы простого латинского квадрата в порядке возрастания для этих двух перестановок для строк и столбцов:

	3	4	6	2	5	1
2	T ₃	S ₃	S ₁	T ₂	T ₁	S ₂
3	S ₂	T ₃	S ₃	S ₁	T ₂	T ₁
6	T ₁	S ₂	T ₃	S ₃	S ₁	T ₂
1	T ₂	T ₁	S ₂	T ₃	S ₃	S ₁
4	S ₁	T ₂	T ₁	S ₂	T ₃	S ₃
5	S ₃	S ₁	T ₂	T ₁	S ₂	T ₃
			↓			
	1	2	3	4	5	6
1	S ₁	T ₃	T ₂	T ₁	S ₃	S ₂
2	S ₂	T ₂	T ₃	S ₃	T ₁	S ₁
3	T ₁	S ₁	S ₂	T ₃	T ₂	S ₃

4	S ₃	S ₂	S ₁	T ₂	T ₃	T ₁
5	T ₃	T ₁	S ₃	S ₁	S ₂	T ₂
6	T ₂	S ₃	T ₁	S ₂	S ₁	T ₃

9. СЛОВАРЬ СИМВОЛОВ

Символ	Определение
<i>a</i>	Точка пересечения с осью ординат кривой линейной регрессии зависимости полученных результатов (эффектов) от дозы или натурального логарифма дозы
<i>b</i>	Угловой коэффициент линейной регрессии зависимости полученных результатов (эффектов) от дозы или натурального логарифма дозы
<i>d</i>	Число уровней дозы для каждого из препаратов (кроме плацебо препарата для модели угловых коэффициентов)
<i>e</i>	Основание натурального логарифма (= 2,71828182845905...)
<i>g</i>	Статистика, применяемая в теореме Филлера (Fieller): $g = \frac{C-1}{C}$
<i>h</i>	Число препаратов, используемых при количественном определении, включая стандартный препарат
<i>m</i>	Оценка активности, рассчитанная как отношение эффектов в общей линейной модели
<i>n</i>	Число повторений для каждого вида воздействия (дозы)
<i>p</i>	Вероятность того, что данная статистика будет больше полученного значения. Используется также для обозначения отношения r/n в пробит-методе
<i>r</i>	Число экспериментальных объектов в группе, у которых наблюдается эффект в ходе количественного определения в модели альтернативных эффектов
<i>s</i>	Оценка стандартного отклонения ($= \sqrt{s^2}$)
s^2	Оценка дисперсии остаточной погрешности (вариации). При однофакторном дисперсионном анализе рассчитывается как ошибка среднеквадратической разности
<i>t</i>	Критерий Стьюдента (Таблица 8.2)
v_{11}, v_{12}, v_{22}	(Ко)вариационные множители для числителя и знаменателя отношения m в теореме Филлера
<i>w</i>	Весовой коэффициент (вес)
<i>x</i>	Натуральный логарифм дозы
<i>y</i>	Индивидуальный полученный результат или преобразованный результат
<i>A</i>	Предполагаемые активности испытуемых препаратов на стадии подбора доз
<i>B</i>	Средний результат в плацебо испытании (контрольном испытании) для модели угловых коэффициентов
<i>C</i>	Статистика, используемая при расчете доверительных интервалов: $C = \frac{1}{1-g}$
C_1, \dots, C_n	Среднее значение для каждого столбца латинского квадрата
D_1, D_2	Среднее значение для периода 1 и периода 2 для двойной перекрестной схемы
<i>F</i>	Отношение двух независимых значений дисперсии при <i>F</i> -распределении (Таблица 8.1)
G_S, G_T, \dots	Усредненные значения доз, используемые при дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов
H_P, H_L	Множители, используемые при дисперсионном анализе для модели параллельных линий
H_B, H_I	Множители, используемые при дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов
<i>I</i>	Натуральный логарифм отношения между соседними дозами для модели параллельных линий или интервал между соседними дозами для модели угловых коэффициентов

J_S, J_T, \dots	Характеристики линейности, используемые при дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов
K	Поправочный коэффициент, используемый для расчета сумм квадратов отклонений при дисперсионном анализе
L	Ширина доверительного интервала, выраженная в логарифмах
L_S, L_T, \dots	Линейные контрасты стандартного и испытуемого препаратов
M'	Натуральный логарифм отношения активностей для данного испытуемого препарата
N	Суммарное число испытаний (видов воздействий или доз) в ходе количественного определения (= dh)
P_S, P_T, \dots	Сумма стандартного (S) и испытуемого (T) препаратов
R	Рассчитанная (оцененная) активность данного испытуемого препарата
R'	Отношение активностей данного испытуемого препарата
R_1, \dots, R_n	Среднее значение данных в каждой строке от 1 до n для схемы латинского квадрата или в каждом боке, для схемы рандомизированных блоков
S	Стандартный препарат
S_1, \dots, S_d	Среднее значение дозы (от минимальной дозы 1 до максимальной дозы d) стандартного препарата S
SS	Сумма квадратов, обусловленная данным источником вариации
T, U, V, \dots	Испытуемые препараты
T_1, \dots, T_d	Среднее значение дозы (от минимальной дозы 1 до максимальной дозы d) испытуемого препарата T
V	Коэффициент вариации, используемый при расчете границ доверительного интервала
W	Весовой коэффициент, применяемый при объединении результатов количественного определения
X	Линейная структура или матрица планирования, используемые в общих линейных моделях
Y	Вектор, представляющий данные (преобразованные) в общих линейных моделях
Z	Первая производная от Φ
α	Верхняя асимптота кривой « $\ln(\text{доза})$ -эффект» в четырехпараметрическом анализе
β	Коэффициент наклона кривой « $\ln(\text{доза})$ -эффект» в четырехпараметрическом анализе
γ	Натуральный логарифм дозы, обеспечивающий 50 % эффекта в четырехпараметрическом анализе
δ	Нижняя асимптота кривой « $\ln(\text{доза})$ -эффект» в четырехпараметрическом анализе
π	3,141592653589793238...
Φ	Функция кумулятивного стандартного нормального распределения характеристической кривой (Таблица 8.4)
χ^2	Критерий хи-квадрат (Таблица 8.3.)

10. ЛИТЕРАТУРА

В данном разделе приведен список рекомендуемой литературы для дополнительного изучения

Finney, D. J. Probit Analysis / D. J. Finney, 3rd Ed. – Cambridge : Cambridge University Press, 1971.

Nelder, J. A. Generalized linear models / J. A. Nelder, Wedderburn, R. W. M. // Journal of the Royal Statistical Society, Series A. – 1972. – Vol. 135, № 3. – P. 370–384.

DeLean, A. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: Application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves / A. DeLean, P. J. Munson, D. Rodbard // Am. J. Physiol. – 1978. – Vol. 235, № 2. – PE97-E102.

Finney, D. J. Statistical Method in Biological Assay / D. J. Finney. – 3rd Ed. – London : Griffin, 1978.

Sokal, R. R. Biometry: Principles and Practice of Statistics in Biological Research / R. R. Sokal, F. R. Rohlf. – 2nd Ed. – New York : W. H. Freeman & CO, 1981.

Peace, K. E. *Biopharmaceutical Statistics for Drug Development*. – New York / Basel : Marcel Dekker Inc., 1988.

Bowerman, B. L. *Linear Statistical Models an Applied Approach* / B. L. Bowerman, R. T. O'Connell Publishing Company. – 1990. 2nd Ed. – Boston : PWS-KENT.

Govindarajulu, Z. *Statistical Techniques in Bioassay* / Z. Govindarajulu. – 2nd revised and enlarged edition. – New York : Karger, 2001.

[#]Беленький, М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. – Л. : Медгиз, 1963. – 152 с.

Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.

Сергиенко, В. И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева. – М. : Гэотар Медицина, 2000. – 256 с.

Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием *Excel* / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2001. – 408 с.

Юнкеров, В. И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В. И. Юнкеров, С. Г. Григорьев. – СПб. : ВМА, 2002. – 267 с.

Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ *STATISTICA*. / О. Ю. Реброва. – М. : Медиа Сфера, 2002. – 305 с.[#]

01/2013:РБ50301

#5.3.1. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ХИМИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

ПРИНЯТЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

В настоящей статье приняты следующие обозначения:

A	Измеряемая величина
a	Свободный член линейной зависимости
b	Угловой коэффициент линейной зависимости
F	Критерий Фишера
$f(x, \mu, \sigma)$	Функция плотности вероятности нормального распределения
H_0	Нулевая гипотеза
H_1	Альтернативная гипотеза
i	Порядковый номер варианты
L	Фактор, используемый при оценке сходимости результатов параллельных определений
m, n	Объемы выборки
P	Доверительная вероятность без конкретизации постановки задачи
P_2, P_1	Доверительная вероятность соответственно при двух- и односторонней постановке задачи
Q_1, Q_n	Контрольные критерии для идентификации грубых погрешностей
R	Размах варьирования
R_c	Общий индекс корреляции
r	(линейный) коэффициент корреляции
$RSD = s_r \cdot 100 \%$	Относительное стандартное отклонение, %
$RSD_{\bar{x}} = s_{\bar{x},r} \cdot 100 \%$	Относительное стандартное отклонение среднего значения, %
s	Стандартное отклонение
s_r	Относительное (по отношению к среднему результату) стандартное отклонение
s^2	Дисперсия
s_r^2	Относительная дисперсия
$s_{\bar{x}}$	Стандартное отклонение среднего результата
$s_{\bar{x},r}$	Относительное (по отношению к среднему результату) стандартное отклонение среднего результата
s_{lg}	Логарифмическое стандартное отклонение
s_{lg}^2	Логарифмическая дисперсия
$s_{lg\bar{x}}$	Логарифмическое стандартное отклонение среднего результата

s_0^2, s_b^2, s_a^2	Общая дисперсия и дисперсия коэффициентов линейной зависимости
t	Критерий Стьюдента
U	Коэффициент для расчета границ среднего результата гарантии качества анализируемого продукта
x, y	Текущие координаты в уравнении линейной зависимости
X_i, Y_i	Вычисленные исходя из уравнения линейной зависимости значения переменных x и y
\bar{x}, \bar{y}	Средние значения выборки (координаты центра линейной зависимости)
x_i, y_i	i -тая варианта (i -тая пара экспериментальных значений x и y)
$\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$	Граничные значения доверительного интервала среднего результата
$x_i \pm \Delta_{x_i}$	Граничные значения доверительного интервала результата единичного определения
Δ	Разность некоторых величин
α	Уровень значимости, степень надежности; погрешность первого рода (вероятность принятия гипотезы H_1 в то время, как на самом деле верна гипотеза H_0)
β	Погрешность второго рода (вероятность принятия гипотезы H_0 в то время, как на самом деле верна гипотеза H_1)
γ	Критическая статистика
Δ_x	Полуширина доверительного интервала неопределенности единичного определения
$\Delta_{\bar{x}}$	Полуширина доверительного интервала неопределенности среднего результата
$\Delta_{x,r}$	Полуширина относительного доверительного интервала неопределенности единичного определения
$\Delta_{\bar{x},r}$	Полуширина относительного доверительного интервала неопределенности среднего результата
$\Delta_{A,r}$	Суммарная неопределенность анализа
$\Delta_{FAO,r}$	Неопределенность конечной аналитической операции
$\Delta_{BS,r}$	Неопределенность аттестации стандартного образца
$\Delta_{SP,r}$	Неопределенность пробоподготовки
δ	Относительная величина систематической погрешности
$\varepsilon, \bar{\varepsilon}$	Относительные неопределенности, соответственно, результата отдельного определения и среднего результата
μ	Истинное значение измеряемой величины
ν	Число степеней свободы; переменный объем выборки при последовательном анализе
ν_{eff}	«Эффективное» число степеней свободы в подходе Уэлча-Сатертуэйта
Σ	Знак суммирования (сумма)
Σ^2	Дисперсия генеральной совокупности
χ^2	Критерий хи-квадрат

Метрологические характеристики методик и результатов, получаемых при статистической обработке данных эксперимента, позволяют проводить оценку и сравнение как экспериментальных методик, так и изучаемых объектов, и на этой основе решать ряд прикладных задач, связанных с определением статистической достоверности результатов исследования. В частности, описанные ниже статистические подходы и метрологические характеристики используются при валидации разрабатываемых методик и оценке корректности полученных результатов анализа.

В главах 1–9 описаны подходы, применяемые при статистическом анализе результатов, являющихся функцией одной случайной переменной. Применение этих подходов для функции нескольких случайных переменных описано в главе 10. В главе 11 приведены необходимые статистические таблицы.

При изложении материала используются термины, принятые в статье #5.3.2. *Валидация аналитических методик и испытаний.*

1. ВЫБОРКА

Термином «выборка» обозначают совокупность статистически эквивалентных результатов (вариант). В качестве такой совокупности можно, например, рассматривать ряд результатов, полученных при параллельных определениях содержания какого-либо вещества в однородной по составу пробе. Отдельные значения вариант выборки объема n принято обозначать через x_i , ($1 < i < n$). Упорядоченная в порядке возрастания выборка может быть представлена в виде:

$$x_1; x_2; \dots x_i; \dots x_{n-1}; x_n. \quad (1.-1)$$

Результаты, полученные при статистической обработке выборки, будут достоверны лишь в том случае, если эта выборка однородна. Проверка однородности выборки обсуждается в главе 1.2. Однако если целью испытаний является проверка однородности серии препарата (например, при проведении испытаний по определению однородности содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (2.9.6) и однородности дозированных единиц (2.9.40)), то оцениваются все полученные результаты (значения вариант) без предварительной проверки однородности выборки.

1.1. СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ И ДИСПЕРСИЯ

В большинстве случаев среднее выборки является наилучшей оценкой истинного значения измеряемой величины μ , если его вычисляют как среднее арифметическое всех вариант:

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n} \quad (1.1.-1)$$

При этом разброс вариант x_i вокруг среднего \bar{x} характеризуется величиной стандартного отклонения s . В количественном химическом анализе величина s часто рассматривается как мера случайной погрешности, свойственной данной методике анализа. Квадрат этой величины s^2 называют дисперсией. Величина дисперсии может рассматриваться как мера воспроизводимости (сходимости) результатов, представленных в данной выборке. Вычисление величин s^2 и s проводят по уравнениям 1.1.-4 и 1.1.-5. Иногда для этого предварительно определяют значения отклонений d_i и число степеней свободы (число независимых вариант) ν :

$$d_i = x_i - \bar{x}, \quad (1.1.-2)$$

$$\nu = n - 1, \quad (1.1.-3)$$

$$s^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{\nu} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{\nu}, \quad (1.1.-4)$$

$$s = \sqrt{s^2}. \quad (1.1.-5)$$

Стандартное отклонение среднего результата $s_{\bar{x}}$ рассчитывают по уравнению:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}. \quad (1.1.-6)$$

Во многих случаях при контроле качества лекарственных средств целесообразно использовать относительные (по отношению к \bar{x}) величины – относительное стандартное отклонение s_r , относительную дисперсию s_r^2 и относительное стандартное отклонение среднего результата $s_{\bar{x},r}$. Их рассчитывают по формулам:

$$s_r^2 = \frac{s^2}{\bar{x}^2}, \quad (1.1.-4a)$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}, \quad (1.1.-5a)$$

$$s_{\bar{x},r} = \frac{s_r}{\sqrt{n}}. \quad (1.1.-6a)$$

Эти относительные величины в зависимости от решаемой задачи могут выражаться также и в процентах к \bar{x} . В этом случае они часто обозначаются соответственно как *RSD* и $RSD_{\bar{x}}$:

$$RSD = s_r \cdot 100\%, \quad (1.1.-5b)$$

$$RSD_{\bar{x}} = s_{\bar{x},r} \cdot 100\%. \quad (1.1.-6b)$$

В фармакопейном анализе абсолютные величины обычно используют для прямых, а относительные – для косвенных методов анализа.

Пример расчетов приведен в главе 9.1.

Если при измерениях получают логарифмы искомым вариант, среднее выборки вычисляют как среднее геометрическое, используя логарифм вариант:

$$\lg \bar{x}_g = \frac{\sum_{i=1}^n \lg x_i}{n}, \quad (1.1.-7)$$

откуда

$$\bar{x} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n} = \text{anti} \lg(\lg \bar{x}_g). \quad (1.1.-8)$$

Значения s^2 , s и $s_{\bar{x}}$ в этом случае также рассчитывают исходя из логарифмов вариант и обозначают соответственно через s_{\lg}^2 , s_{\lg} и $s_{\lg \bar{x}}$.

1.2. ПРОВЕРКА ОДНОРОДНОСТИ ВЫБОРКИ. ИСКЛЮЧЕНИЕ ВЫПАДАЮЩИХ ЗНАЧЕНИЙ ВАРИАНТ

Как было указано выше, значения \bar{x} , s^2 , s и $s_{\bar{x}}$ могут быть признаны достоверными, если ни одна из вариант выборки не отягощена грубой погрешностью, т.е. если выборка однородна. Выявление грубых погрешностей (выбросов) – это весьма деликатная задача, относительно которой в литературе нет единого устоявшегося мнения (смотрите, например, Раздел 7.3 статьи 5.3. *Статистический анализ результатов биологических испытаний и тестов*). Особенно это относится к выборкам совсем малого объема (3–5 измерений). Проверку таких выборок на однородность целесообразно проводить только в том случае, если методика метрологически аттестована (см. главу 6.1). Ниже приводятся наиболее часто используемые подходы для проверки однородности выборок малого ($n \leq 10$) и большого ($n > 10$) объемов.

Проверка однородности выборок малого объема ($n \leq 10$) осуществляется без предварительного вычисления статистических характеристик. С этой целью после представления выборки в виде (1.-1) для крайних вариант x_1 и x_n (которые предполагаются выпадающими) рассчитывают значения контрольного критерия Q исходя из величины размаха варьирования R :

$$R = \begin{cases} |x_1 - x_n| & \text{для } n = 3 \dots 7 \\ |x_1 - x_{n-1}| & \text{для } n = 8 \dots 10 \end{cases}, \quad (1.2.-1)$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R}, \quad (1.2.-2a)$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R}, \quad (1.2.-2b)$$

Выборка признается неоднородной, если хотя бы одно из вычисленных значений Q_1 или Q_n превышает табличное значение $Q(P_1, n)$, найденное для доверительной вероятности P_1 (таблица 11.-1). Варианты x_1 или x_n , которым соответствует значение $Q > Q(P_1, n)$, отбрасываются и для полученной выборки уменьшенного объема выполняют новый цикл вычислений по уравнениям 1.2.-1 и 1.2.-2 с целью проверки ее однородности.

При $|x_1 - x_2| < |x_2 - x_3|$ и $|x_n - x_{n-1}| < |x_{n-1} - x_{n-2}|$ уравнения 1.2.-2a и 1.2.-2b принимают вид:

$$Q_1 = \frac{|x_2 - x_3|}{R}; \quad Q_n = \frac{|x_{n-1} - x_{n-2}|}{R}. \quad (1.2.-3)$$

Полученная в конечном счете однородная выборка используется для вычисления \bar{x} , s^2 , s и $s_{\bar{x}}$.

Пример расчетов приведен в главе 9.2.

Для выборок большого объема ($n > 10$) проверку однородности проводят после предварительного вычисления статистических характеристик \bar{x} , s^2 , s и $s_{\bar{x}}$. При этом выборка признается однородной, если для всех вариантов (1.1.-2) выполняется условие:

$$|d_i| \leq 3s. \quad (1.2.-4)$$

Если выборка признана неоднородной, то варианты, для которых \bar{x} , s^2 , s и $s_{\bar{x}}$, отбрасываются как отягощенные грубыми погрешностями с доверительной вероятностью $P_2 > 99,0\%$. В этом случае для полученной выборки сокращенного объема повторяют цикл вычислений статистических характеристик по уравнениям (1.1.-1–1.1.-6) и снова проводят проверку однородности. Вычисление статистических характеристик считают законченным, когда выборка сокращенного объема оказывается однородной.

1.3. ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ И ОЦЕНКА ИХ ВЕЛИЧИНЫ

Если случайная однородная выборка конечного объема n получена в результате последовательных измерений некоторой величины A , имеющей истинное значение μ , то среднее этой выборки \bar{x} следует рассматривать лишь как приближенную оценку A . Достоверность этой оценки характеризуется величиной доверительного интервала $\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$, для которой с заданной доверительной вероятностью P выполняется условие:

$$(\bar{x} - \Delta_{\bar{x}}) \leq \mu \leq (\bar{x} + \Delta_{\bar{x}}). \quad (1.3.-1)$$

Следует отметить, что данный доверительный интервал не характеризует (как это нередко считается) погрешность определения величины μ , поскольку найденная величина \bar{x} может быть в действительности очень близка к истинному значению μ . Но мы этого истинного значения не знаем. Полученный доверительный интервал характеризует степень

неопределенности наших знаний об истинном значении μ величины A по результатам последовательных измерений выборки конечного объема n . Поэтому правильно говорить (и далее это будет использоваться) о «неопределенности результатов анализа» (которая характеризуется доверительным интервалом) вместо выражения «погрешность результатов анализа», которое нередко используется не совсем корректно.

Расчет граничных значений доверительного интервала при известном значении стандартного отклонения s или для выборок большого объема проводят по уравнению

$$(\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}) = \bar{x} \pm \frac{U(P) \cdot s}{\sqrt{n}}, \quad (1.3.-2)$$

предполагая, что варианты, входящие в выборку, распределены нормально. Здесь $U(P)$ – табличное значение функции нормального распределения.

Для выборок небольшого объема граничные значения доверительного интервала рассчитывают с использованием критерия Стьюдента:

$$(\bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}) = \bar{x} \pm \frac{t(P, \nu) \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (1.3.-3)$$

или с использованием относительных величин:

$$\left(1 \pm \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}}\right) = (1 \pm \Delta_{\bar{x},r}) = 1 \pm \frac{t(P, \nu) \cdot s_r}{\sqrt{n}}, \quad (1.3.-3a)$$

где:

$t(P, \nu)$ – табличное значение критерия Стьюдента (таблица 11.-2). Распределение Стьюдента $t(P, \nu)$ является обобщением нормального распределения $U(P)$ и переходит в него при достаточно большом числе степеней свободы ν , т.е. $t(P, \nu) \rightarrow U(P)$. С учетом этого для единообразия далее везде будут использоваться более часто употребляемые соотношения (1.3.-3) и (1.3.-3a), даже если речь идет об обработке выборок достаточно большого объема.

Полуширины относительных доверительных интервалов единичного ($\Delta_{\bar{x},r}$) и среднего ($\Delta_{\bar{x},r}$) результатов часто выражают в процентах к \bar{x} . В этом случае в выражении (1.3.-3a) вместо величины s_r используют RSD , а вместо 1 берут 100 %, т.е.:

$$(100 \pm \Delta_{\bar{x},r} \%) = 100 \pm \frac{t(P, \nu) \cdot RSD}{\sqrt{n}}. \quad (1.3.-3b)$$

Если при измерении одной и той же методикой двух близких значений A были получены две случайные однородные выборки с объемами n и m , то при $m < n$ для выборки объема m справедливо выражение:

$$\bar{x}_{(m)} \pm \Delta_{\bar{x}(m)} = \bar{x}_{(m)} \pm \frac{t(P, \nu_{(n)}) \cdot s_{(n)}}{\sqrt{m}} \quad (1.3.-4)$$

(индекс указывает принадлежность величин к выборке объема m или n).

Выражение (1.3.-4) позволяет оценить величину доверительного интервала среднего $\bar{x}_{(m)}$, найденного исходя из выборки объема m .

Иными словами, доверительный интервал среднего выборки относительно малого объема m может быть сужен благодаря использованию известных величин $s_{(n)}$ и $t(P, \nu_{(n)})$,

найденных ранее для выборки большего объема n . Более общим подходом является объединение выборок с расчетом объединенного стандартного отклонения и степеней свободы по уравнениям (2.1.1.-1–2.1.1.-2). Это стандартное отклонение и соответствующий объединенному числу степеней свободы критерий Стьюдента подставляются затем в выражение (1.3.-4).

Пример расчетов в процентах приведен в главе 9.3.

Аналогично (1.3.-1–1.3.-3) определяется доверительный интервал результата отдельного определения. Подставляя $n = 1$ в выражение 1.3.-3, получаем:

$$x_i \pm \Delta_x = x_i \pm t(P, \nu) \cdot s \quad (1.3.-5)$$

или с использованием относительных величин:

$$\frac{x_i}{\bar{x}} \pm \Delta_{x,r} = \frac{x_i}{\bar{x}} \pm t(P, \nu) \cdot s_r \quad (1.3.-5a)$$

Этот интервал является доверительным интервалом результата отдельного определения. Для него с доверительной вероятностью P выполняются взаимосвязанные условия:

$$x_i - \Delta_x \leq \mu \leq x_i + \Delta_x, \quad (1.3.-6)$$

$$\mu - \Delta_x \leq x_i \leq \mu + \Delta_x. \quad (1.3.-7)$$

Значения $\Delta_{\bar{x}}$ и $\Delta_{x,r}$ из выражений (1.3.-3) и (1.3.-5) используют при вычислении относительных неопределенностей отдельной варианты (ε) и среднего результата ($\bar{\varepsilon}$), выражая эти величины в процентах:

$$\varepsilon = \Delta_{x,r} \cdot 100\% = \frac{\Delta_x}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (1.3.-8)$$

$$\bar{\varepsilon} = \Delta_{\bar{x},r} \cdot 100\% = \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (1.3.-8a)$$

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариантов, выражения (1.3.-3) и (1.3.-5) принимают вид:

$$\lg \bar{x} \pm \Delta_{\lg \bar{x}} = \lg \bar{x} \pm \frac{t(P, \nu) \cdot s_{\lg}}{\sqrt{n}}, \quad (1.3.-9)$$

$$\lg x_i \pm \Delta_{\lg x_i} = \lg x_i \pm t(P, \nu) \cdot s_{\lg}, \quad (1.3.-10)$$

Потенцирование выражений (1.3.-9) и (1.3.-10) приводит к несимметричным доверительным интервалам для значений \bar{x} и x_i :

$$\text{anti} \lg(\lg \bar{x} - \Delta_{\lg \bar{x}}) \leq \bar{x} \leq \text{anti} \lg(\lg \bar{x} + \Delta_{\lg \bar{x}}), \quad (1.3.-11)$$

$$\text{anti} \lg(\lg x_i - \Delta_{\lg x_i}) \leq x_i \leq \text{anti} \lg(\lg x_i + \Delta_{\lg x_i}), \quad (1.3.-12)$$

где:

$$\Delta_{\lg \bar{x}} = \frac{t(P, \nu) \cdot s_{\lg}}{\sqrt{n}}, \quad (1.3.-13)$$

$$\Delta_{\lg x_i} = t(P, \nu) \cdot s_{\lg}. \quad (1.3.14)$$

При этом для нижних и верхних границ доверительных интервалов \bar{x} и x_i имеем:

$$\bar{\varepsilon} = \left[\frac{|\text{anti lg}(\lg \bar{x} \pm \Delta_{\lg \bar{x}}) - \bar{x}|}{\bar{x}} \right] 100\% \quad (1.3.-15a)$$

$$\varepsilon = \left[\frac{|\text{anti lg}(\lg x_i \pm \Delta_{\lg x_i}) - x_i|}{x_i} \right] 100\% \quad (1.3.-15b)$$

1.4. ОДНОСТОРОННИЕ И ДВУСТОРОННИЕ ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ

Соотношения (1.3.-1–1.3.-15) характеризуют так называемые «двусторонние» доверительные интервалы. Они основаны на двустороннем t -распределении и широко применяются при оценке точности методик и представлении результатов. Однако при решении вопросов гарантии качества продукции (глава 6), а также при контроле серийной продукции, в частности, при контроле качества лекарственных средств, нередко возникает необходимость использования так называемых «односторонних» доверительных интервалов. Например, для какого-нибудь готового лекарственного средства допуски содержания активного компонента установлены от 90 % до 110 % от номинального. В процессе анализа получено среднее значение содержания $\bar{x} = 94\%$ от номинального значения. Нас интересует, не выходит ли доверительный интервал за допуски содержания (90–110 %). Очевидно, что в данном случае этот доверительный интервал может выйти за пределы только нижнего допуска (90 %), но не нижнего и верхнего (110 %) одновременно. Вопрос о возможности выхода истинной величины μ за пределы верхнего допуска нас в данном случае не интересует (в связи с его крайне низкой вероятностью). Таким образом, истинное значение μ находится в интервале

$$\bar{x} - \Delta_{\bar{x}} \leq \mu \leq \infty \quad (1.4.-1a)$$

Аналогичное выражение можно записать для случая, когда \bar{x} превышает 100 % (например, $\bar{x} = 105\%$):

$$\infty \leq \mu \leq \bar{x} + \Delta_{\bar{x}} \quad (1.4.-1b)$$

Соотношения (1.4.-1a–1.4.-1b) характеризуют односторонние доверительные интервалы, поскольку величина μ ими ограничивается только с одной стороны. Это отличает их от соотношения (1.3.-1), где величина μ ограничивается с обеих сторон. Табличные значения критерия Стьюдента для одностороннего и двустороннего распределения приведены в таблице 11.-2. Существует следующее соотношение между двусторонним (P_2) и односторонним (P_1) критериями Стьюдента:

$$t[P_2, \nu] = t[(2P_1 - 1), \nu] \quad (1.4.-2)$$

В частности, односторонний критерий Стьюдента для вероятности 0,95 (т.е. 95 %) совпадает с двусторонним критерием Стьюдента для вероятности 0,90 (т.е. 90 %).

Таким образом, P_2 – это вероятность того, что математическое ожидание (или истинное значение) оцениваемой величины находится в двусторонне ограниченных пределах (1.3.-1–1.3.-15), а P_1 – это вероятность того, что оно находится в односторонне ограниченных пределах (1.4.-1–1.4.-2). В литературе (в частности, в таблицах) нередко используются обозначаемые по-разному величины $(1 - P_2)$ и $(1 - P_1)$, которые характеризуют вероятность того, что математическое ожидание (или истинное значение) оцениваемой величины выходит за вышеуказанные пределы. Во многих случаях такие величины являются более удобными.

2. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА

Метрологические характеристики методики устанавливают путем статистической обработки одной выборки или совместной статистической обработки нескольких выборок из одной и той же генеральной совокупности. В качестве таких выборок могут использоваться как данные аналитического архива лаборатории, так и результаты, полученные специально при анализе образцов с известным содержанием определяемого компонента μ . Результаты статистической обработки могут быть представлены в виде таблицы 2.-1.

Таблица 2.-1

Метрологические характеристики методики анализа

μ	ν	\bar{x}	s	P	$t(P, \nu)$	Δ_x	ε
1	2	3	4	5	6	7	8

Во многих случаях проще использовать относительные (по отношению к μ) величины. Результаты статистической обработки могут быть представлены в этом случае в виде таблицы 2.-1а.

Таблица 2.-1а

Метрологические характеристики методики анализа

μ	ν	\bar{x} / μ	s	s_r	P	$t(P, \nu)$	$\Delta_{x,r}$	ε
1	2	3	4	5	6	7	8	9

2.1. ОБЪЕДИНЕНИЕ ВЫБОРОК

2.1.1. Объединенная дисперсия и объединенное среднее

Если имеется g выборок из одной генеральной совокупности с порядковыми номерами k ($1 < k < g$), расчет дисперсии s^2 целесообразно проводить по формуле:

$$s^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \sum_{i=1}^{i=n_k} d_{ik}^2}{\nu_t} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} [(n_k - 1) s_k^2]}{\nu_t} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \left(\sum_{i=1}^{i=n_k} x_{ik}^2 - n_k \bar{x}_k^2 \right)}{\nu_t} \quad (2.1.1.-1)$$

или для относительных величин, принимая во внимание, что $n_k - 1 = \nu_k$

$$s_r^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \nu_k \cdot s_{k,r}^2}{\nu_t} \quad (2.1.1.-1a)$$

$$RSD_{tot}^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} v_k \cdot RSD_k^2}{v_t} \quad (2.1.1.-1b)$$

При этом объединенное число степеней свободы v_t равно

$$v_t = \sum_{k=1}^g v_k \quad (2.1.1.-2)$$

- \bar{x}_k – среднее k -ой выборки;
- n_k – число вариантов в k -ой выборке;
- v_k – число степеней свободы в k -ой выборке;
- x_{ik} – i -ая варианта k -ой выборки;
- s_k^2 – дисперсия k -ой выборки;
- $s_{k,r}^2$ – относительная дисперсия k -ой выборки;
- d_{ik} – отклонение i -ой варианты k -ой выборки.

Если g выборок из одной генеральной совокупности с порядковыми номерами k ($1 < k < g$) характеризуются выборочными средними значениями \bar{x}_k , полученными из n_k вариант, то объединенное среднее значение \bar{x} по всем выборкам рассчитывают по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} n_k \cdot \bar{x}_k}{\sum_{k=1}^{k=g} n_k} \quad (2.1.1.-3)$$

Необходимым условием совместной статистической обработки нескольких выборок является отсутствие статистически значимой разницы между отдельными значениями s_k^2 (т.е. справедливость гипотезы равенства дисперсий). В простейшем случае можно ограничиться сравнением крайних значений s_k^2 с использованием критерия Фишера F , как указано в главе 3. В более общем случае используют критерии Бартлетта и Кохрена.

2.1.2. Критерий Бартлетта

Для проверки гипотезы, что все s_k^2 принадлежат одной генеральной совокупности, используют выражение, приближенно распределенное как χ^2 :

$$\chi^2 = 2,303 \cdot \left(v_t \cdot \lg s^2 - \sum_{k=1}^g v_k \cdot \lg s_k^2 \right) \quad (2.1.2.-1)$$

При этом величины s^2 и v_t рассчитываются по уравнениям (2.1.1.-1) и (2.1.1.-2). Найденная таким образом величина χ^2 сравнивается с процентной точкой хи-квадрат распределения $\chi^2(P, v_x)$ (таблица 11.-3). Если имеется g выборок, то число степеней свободы для $\chi^2(P, v_x)$ берется равным $v_x = g - 1$. Проверяемая гипотеза принимается при условии $\chi^2 < \chi^2(P, v_x)$. В противном случае вычисленное значение χ^2 корректируют по формуле

$$\chi^{*2} = \frac{\chi^2}{C}, \quad (2.1.2.-2)$$

Где

$$C = \frac{\sum_{k=1}^g (1/v_k) - 1/v_r}{3(g-1)} + 1,$$

и снова сравнивают с процентной точкой хи-квадрат распределения $\chi^2(P_1, v_z)$. Если $\chi^{*2} > \chi^2(P_1, v_z)$, то между некоторыми стандартными отклонениями имеются значимые различия. В этом случае необходимо провести анализ имеющихся данных, отбросить одно или несколько значений дисперсии, наиболее сильно отличающиеся от остальных, и снова провести тест Бартлетта. Нужно иметь в виду, что критерий Бартлетта (так же, как и критерий Кохрена) очень чувствителен к нарушению требования нормальности. Но именно поэтому он может быть весьма полезен при формировании надежных аналитических архивов.

Описанный критерий Бартлетта применим только при условии, что число степеней свободы у всех объединяемых дисперсий больше 3 (т.е. все $v_k > 3$). Однако именно этот случай, когда $v_k < 3$, нередко и представляет наибольший интерес. Поэтому Бартлеттом была предложена более сложная модификация данного критерия, применимая при любых степенях свободы. Однако использование ее на практике достаточно затруднительно без применения ЭВМ.

2.1.3. Критерий Кохрена

В том случае, когда все объединяемые дисперсии имеют одинаковое число степеней свободы (т.е. $v_1 = v_2 = \dots = v_g = v$), для проверки гипотезы равенства дисперсий можно применять значительно более простой критерий Кохрена со статистикой:

$$G = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{k=1}^g s_k^2}, \quad (2.1.2.-3)$$

$$s_{\max}^2 = \max(s_k^2).$$

Критические точки критерия Кохрена приведены в таблице 11.-4. Рассчитанное значение G на выбранном уровне значимости (95 % или 99 %) не должно превосходить табличное значение. В противном случае гипотеза равенства дисперсий не может быть принята и формулы (2.1.1.-1–2.1.1.-2) объединения выборок не являются корректными.

В формулах (2.1.1.-1) и (2.1.2.-3) вместо абсолютных величин s_k^2 могут использоваться относительные величины $s_{r,k}^2$ и RSD_k .

Примеры использования критериев Бартлетта и Кохрена приведены в главе 9.4.

2.2. ПРОВЕРКА НАЛИЧИЯ ЗНАЧИМОЙ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ПОГРЕШНОСТИ

При известном содержании определяемого компонента μ в образце следует решить вопрос о наличии статистически значимой систематической погрешности. Для этого вычисляют критерий Стьюдента t :

$$t = \frac{|\mu - \bar{x}| \cdot \sqrt{m}}{s} \quad (2.2.-1)$$

или в относительных величинах:

$$t = \frac{\left|1 - \frac{\bar{x}}{\mu}\right| \cdot \sqrt{m}}{s_r} \quad (2.2.-1a)$$

Если, например, при $P = 95\%$ и $\nu = m - 1$ реализуется неравенство

$$t > t(P, \nu), \quad (2.2.-2)$$

то полученные данной методикой результаты отягощены систематической погрешностью, относительная величина которой δ может быть оценена по формуле:

$$\delta = \left|1 - \frac{\bar{x}}{\mu}\right| \cdot 100\% \quad (2.2.-3)$$

Значимые систематические погрешности (т.е. погрешности, для которых реализуется неравенство (2.2.-2)) должны быть обязательно исключены из результатов анализа.

Пример расчета приведен в главе 9.4.

При проведении статистической обработки нескольких выборок, полученных при анализе образцов с разным содержанием определяемого компонента μ , данные в графах 1, 2, 3, 4, 7 и 8 таблицы 2.-1 приводят непосредственно для каждой выборки. При этом в графах 2, 4, 6, 7 в последней строке под чертой приводят средние значения ν , s , t , Δ_x .

Также для расчета метрологических характеристик методики используются данные из аналитического архива, значение μ неизвестно и, соответственно, заполняются не все графы таблицы 2.-1.

3. СРАВНЕНИЕ ДВУХ МЕТОДИК АНАЛИЗА ПО ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ

Данное сравнение проводят путем выяснения значимости различия выборочных дисперсий анализа этих двух методик. В более общем случае данный подход применяется для оценки значимости различия двух выборочных дисперсий, например, с целью выяснения, можно ли их считать выборочными оценками одной и той же дисперсии генеральной совокупности.

При сравнении воспроизводимости (сходимости) двух методик анализа с оценками дисперсий s_1^2 и s_2^2 ($s_1^2 > s_2^2$) вычисляют критерий Фишера F :

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (3.-1)$$

Критерий F характеризует при $s_1^2 > s_2^2$ достоверность различия между s_1^2 и s_2^2 .

Вычисленное значение F сравнивают с табличным значением $F(P_1, \nu_1, \nu_2)$, найденным при $P_1 = 99\%$ (таблица 11.-5).

Если

$$F > F(P_1, \nu_1, \nu_2), \quad (3.-2)$$

Во многих случаях проще использовать относительные (по отношению к \bar{x}) величины. В этом случае целесообразно проводить расчеты по таблице 4.-1а.

Таблица 4.-1а

Метрологические характеристики среднего результата

m	ν	\bar{x}	s	s_r	$s_{\bar{x},P}$	P	$t(P,\nu)$	$\Delta_{\bar{x},P}$	$\bar{\epsilon}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Таким образом, на основании выражения (1.3.-1) для измеряемой величины A при незначительности систематической погрешности с вероятностью P выполняется условие:

$$\bar{x} - \Delta_{\bar{x}} \leq A \leq \bar{x} + \Delta_{\bar{x}}, \quad (4.-1)$$

т.е.

$$A = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}, \quad (4.-2)$$

или с использованием относительных величин:

$$\frac{A}{\bar{x}} = 1 \pm \Delta_{\bar{x},r} \quad (4.-2a)$$

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариантов, в графе 9 таблицы 4.-1 приводят величину $\Delta_{\lg \bar{x}}$, а каждую из граф 3, 9 и 10 разбивают на две (а, б). В графе 3а приводят значение \bar{x}_g , в графе 3б – значение $\lg \bar{x}_g$, в графах 9а и 9б – соответственно значения нижней и верхней границ доверительного интервала для \bar{x}_g (уравнения (1.3.-11) и (1.3.-12)). Наконец, в графе 10 приводят максимальное по абсолютной величине значение ϵ (уравнение (1.3.-15а)).

5. СРАВНЕНИЕ СРЕДНИХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДВУХ ВЫБОРОК

Если в результате измерений одной и той же величины A получены две выборки объема n_1 и n_2 , причем $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$, может возникнуть необходимость проверки статистической достоверности гипотезы:

$$\bar{x}_1 = \bar{x}_2, \quad (5.-1)$$

т.е. значимости разности $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$.

Такая проверка необходима, если величина A определялась двумя разными методиками с целью их сравнения или если величина A определялась одной и той же методикой для двух разных объектов, идентичность которых требуется доказать. Для проверки гипотезы (5.-1) следует установить, существует ли статистически значимое различие между дисперсиями s_1^2 и s_2^2 . Эта проверка проводится так, как указано в главе 3.

Рассмотрим три случая.

5.1. РАЗЛИЧИЕ ДИСПЕРСИЙ s_1^2 И s_2^2 СТАТИСТИЧЕСКИ НЕЗНАЧИМО

Различие дисперсий s_1^2 и s_2^2 статистически незначимо, когда справедливо неравенство (3.-3). В этом случае средневзвешенное значение s^2 вычисляют по уравнению (2.1.1.-1), а дисперсию s_p^2 разности $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ по уравнению (5.1.-1):

$$s_p^2 = \frac{s^2 \cdot (n_1 + n_2)}{n_1 \cdot n_2}, \quad (5.1.-1)$$

$$s_p = \sqrt{s_p^2}. \quad (5.1.-2)$$

Далее вычисляют критерий Стьюдента:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_p} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}, \quad (5.1.-3)$$

$$\nu = n_1 + n_2 - 2. \quad (5.1.-4)$$

Если при выбранном значении P_2 (например, при $P = 95\%$)

$$t > t(P_2, \nu), \quad (5.1.-5)$$

то результат проверки положителен: разность $(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$ является значимой, и гипотезу $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ отбрасывают. В противном случае надо признать, что эта гипотеза не противоречит экспериментальным данным.

5.2. РАЗЛИЧИЕ ДИСПЕРСИЙ s_1^2 И s_2^2 СТАТИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМО

Различие дисперсий s_1^2 и s_2^2 статистически значимо, когда справедливо неравенство (3.-2). Если $s_1^2 > s_2^2$, дисперсию s_p^2 разности $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ находят по уравнению (5.2.-1), а число степеней свободы по уравнению (5.2.-2):

$$s_p^2 = \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}, \quad (5.2.-1)$$

$$\nu' = (n_1 + n_2 - 2) \cdot \left(0,5 + \frac{s_1^2 \cdot s_2^2}{s_1^4 + s_2^4} \right). \quad (5.2.-2)$$

Следовательно, в данном случае

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_p} = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_2 \cdot s_1^2 + n_1 \cdot s_2^2}}. \quad (5.2.-3)$$

Вычисленное по уравнению (5.2.-3) значение t сравнивают с табличным значением $t(P_2, \nu')$, как это описано выше для случая 1.

Рассмотрение проблемы упрощается, когда $n_1 \approx n_2$ и $s_1^2 \gg s_2^2$. Тогда в отсутствие систематической погрешности среднее \bar{x} выборки объема n_2 принимают за достаточно точную оценку величины A , т.е. принимают $\bar{x}_2 = \mu$. Справедливость гипотезы $\bar{x}_1 = \mu$, эквивалентной гипотезе (5.-1), проверяют с помощью выражений (2.2.-1) и (2.2.-2), принимая $\nu_1 = n_1 - 1$. Гипотеза (5.-1) отклоняется как статистически недостоверная, если выполняется неравенство (2.2.-2).

5.3. ИЗВЕСТНО ТОЧНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ A

Если $A = m$, проверяют две гипотезы: $\bar{x}_1 = \mu$ и $\bar{x}_2 = \mu$. Проверку выполняют так, как описано в главе 2 с помощью выражений (2.2.-1) и (2.2.-2), отдельно для каждой из гипотез. Если обе проверяемые гипотезы статистически достоверны, то следует признать достоверной и гипотезу (5.-1). В противном случае гипотеза (5.-1) должна быть отброшена.

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариантов, при сравнении средних используют величины $\lg \bar{x}_s$, s_{lg}^2 и s_{lg} . В тех случаях, когда разность $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ оказывается значимой, определяют доверительный интервал для разности соответствующих генеральных средних $|\epsilon_1 - \epsilon_2|$:

$$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - t(P_2, \nu) \cdot s_p \leq |\epsilon_1 - \epsilon_2| \leq |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| + t(P_2, \nu) \cdot s_p. \quad (5.3.-1)$$

Пример расчетов приведен в главе 9.6.

6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МЕТРОЛОГИЧЕСКИ АТТЕСТОВАННОЙ МЕТОДИКИ

Данная интерпретация основывается на том, что для метрологически аттестованной методики известна принятая оценка стандартного отклонения.

6.1. ОЦЕНКА СХОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

При рутинных анализах аналитик обычно проводит 2–3, реже 4 параллельных определения. Варианты полученной при этом упорядоченной выборки объема m , как правило, довольно значительно отличаются друг от друга. Если методика анализа метрологически аттестована, то максимальная разность результатов двух параллельных определений должна удовлетворять неравенству:

$$|x_1 - x_n| < L(P, m) \cdot s, \quad (6.1.-1)$$

где:

s – принятая оценка стандартного отклонения;

$L(P, m)$ – фактор, вычисленный по Пирсону при $P = 95\%$.

Если неравенство (6.1.-1) не выполняется, необходимо провести дополнительное определение и снова проверить, удовлетворяет ли величина $|x_1 - x_n|$ неравенству (6.1.-1).

m	2	3	4
L	2,77	3,31	3,65

Если для результатов четырех параллельных определений неравенство (6.1.-1) не выполняется, следует считать, что конкретные условия анализа привели к снижению воспроизводимости методики и принятая оценка величины s применительно к данному случаю является заниженной. В этом случае поступают, как указано в главе 1.2.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОБХОДИМОГО ЧИСЛА ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

Если необходимо получить средний результат с относительной неопределенностью $\bar{\varepsilon} \leq \phi$ (где ϕ – некоторое число, например, 2 %), причем методика анализа метрологически аттестована, необходимое число параллельных определений m находят из уравнения:

$$m \geq \left(\frac{\Delta_x \cdot 100}{\phi \cdot \bar{x}} \right)^2 \quad (6.2.-1)$$

6.3. ГАРАНТИЯ КАЧЕСТВА ПРОДУКЦИИ

Описанный ниже подход применим к метрологически аттестованной методике. В других случаях могут применяться иные подходы (см. общую статью #5.3.2. *Валидация аналитических методик и испытаний*).

Предположим, что качество продукции регламентируется предельными значениями a_{\min} и a_{\max} величины A , которую определяют на основании результатов анализа. Примем, что вероятность соответствия качества продукта условию

$$a_{\min} < A < a_{\max}, \quad (6.3.-1)$$

должна составлять P_1 .

Пусть величину A находят экспериментально как среднее выборки объема m , а методика ее определения метрологически аттестована. Тогда условие (6.3.-1) будет выполняться с вероятностью P_1 , если значение $\bar{x} = A$ будет лежать в пределах

$$a_{\min} + \Delta_{\bar{x}} < A < a_{\max} - \Delta_{\bar{x}}, \quad (6.3.-2)$$

где:

$$\Delta_{\bar{x}} = \frac{U(P_1) \cdot s}{\sqrt{m}} \quad (6.3.-3)$$

Значения коэффициента U для вероятности $P_1 = 95\%$ и $P_1 = 99\%$ соответственно равны 1,65 и 2,33.

Иными словами, для гарантии качества наблюдаемые пределы изменения величины A на практике следует ограничить значениями:

$$A_{\min} = a_{\min} + \Delta_{\bar{x}} = a_{\min} + \frac{U(P_1) \cdot s}{\sqrt{m}}, \quad (6.3.-4)$$

$$A_{\max} = a_{\max} - \Delta_{\bar{x}} = a_{\max} - \frac{U(P_1) \cdot s}{\sqrt{m}} \quad (6.3.-5)$$

Наоборот, если заданы значения A_{\min} и A_{\max} , значения a_{\min} и a_{\max} , входящие в неравенство (6.3.-1), могут быть найдены путем решения уравнений (6.3.-4) и (6.3.-5). Наконец, если заданы пары значений A_{\min} , a_{\min} и A_{\max} , a_{\max} , то уравнения (6.3.-4) и (6.3.-5) могут быть решены относительно m . Это может быть использовано для оценки необходимого числа параллельных определений величины A .

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариант, описанные в главе 6, вычисления проводят с использованием величин $\lg x_g$, $\lg x_i$, s_{lg} и т.п. Примеры расчетов приведены в главе 9.7.

7. РАСЧЕТ И СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

При использовании ряда химических и физико-химических методов количественного анализа непосредственному измерению подвергается некоторая величина y , которая является линейной функцией искомой концентрации (количества) x определяемого вещества или элемента. Иными словами, в основе таких методов анализа лежит существование линейной зависимости:

$$y = bx + a, \quad (7-1)$$

где:

y – измеряемая величина;

x – концентрация (количество) определяемого вещества или элемента;

b – угловой коэффициент линейной зависимости;

a – свободный член линейной зависимости.

Для использования зависимости (7.-1) в аналитических целях, т.е. для определения конкретной величины x по измеренному значению y , необходимо заранее найти числовые значения констант b и a , т.е. провести калибровку. Иногда константы функции (7.-1) имеют тот или иной физический смысл, и их значения должны оцениваться с учетом соответствующего доверительного интервала. Если калибровка проведена и значения констант a и b определены, величину x находят по измеренному значению y_i :

$$x_i = \frac{1}{b} y_i - \frac{a}{b}. \quad (7.-2)$$

При калибровке величину x рассматривают как аргумент, а величину y – как функцию. Наличие линейной зависимости между x и y не всегда является очевидным. По этой причине экспериментальные данные, полученные при калибровке, в первую очередь используют для оценки жесткости, т.е. степени неслучайности линейной связи между x и y , и лишь затем определяют значения констант a и b и их доверительные интервалы. В первом приближении судить о жесткости линейной связи между переменными x и y можно по величине линейного коэффициента корреляции (или просто коэффициента корреляции) r , который вычисляют по формуле:

$$r = \frac{m \cdot \sum_1^m x_i y_i - \sum_1^m x_i \cdot \sum_1^m y_i}{\sqrt{\left[m \cdot \sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i \right)^2 \right] \left[m \cdot \sum_1^m y_i^2 - \left(\sum_1^m y_i \right)^2 \right]}} \quad (7.-3)$$

исходя из экспериментальных данных.

Линейный коэффициент корреляции r изменяется в пределах от -1 до $+1$. Положительные значения r указывают на рост, а негативные – на уменьшение y с ростом x .

Линейный коэффициент корреляции r является частным случаем общего индекса корреляции R_c , который применим также и для нелинейных зависимостей между величинами y и x :

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{s_0^2}{s_y^2}}, \quad (7.-3a)$$

где:

s_0 – остаточное стандартное отклонение (уравнение (7.-7));

s_y – стандартное отклонение величин y_i относительно среднего значения \bar{y} (уравнение (7.-15)); рассчитывают с использованием уравнения (1.1.-4).

Уравнение (7.-3а) в силу своей простоты и наглядности нередко используется вместо соотношения (7.-3) в том случае, когда знак коэффициента корреляции не имеет значения.

Чем ближе абсолютная величина $|r|$ к единице, тем менее случайна наблюдаемая линейная зависимость между переменными x и y .

Коэффициент корреляции r используется обычно для выявления стохастической взаимосвязи между величинами, функциональная зависимость между которыми может и отсутствовать. Коэффициент корреляции является значимым, если его величина для данной вероятности P и числа степеней свободы ν превышает значения, приведенные в таблице 11.-6. В противном случае нельзя говорить о существовании значимых зависимостей (7.-1–7.-2).

Значимость коэффициента корреляции является обязательным, но не достаточным условием использования уравнений (7.-1–7.-2) для аналитических целей (см. ниже). В аналитической химии в большинстве случаев используют линейные зависимости с коэффициентом корреляции $|r| \geq 0,98$ (при соответствии требованиям таблицы 11.-6), и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости с коэффициентом корреляции $|r| \geq 0,9$.

Коэффициенты a и b и другие метрологические характеристики зависимости (7.-1) рассчитывают с использованием метода наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x . Пусть в результате эксперимента найдены представленные в таблице 7.-1 пары значений аргумента x и функции y .

Таблица 7.-1

i	x_i	y_i
1	x_1	y_1
2	x_2	y_2
...
m	x_m	y_m

Тогда, если величины y_i имеют одинаковую неопределенность (а такое допущение обычно выполняется для достаточно узкого диапазона варьирования величин y_i), то:

$$b = \frac{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i y_i - \sum_{i=1}^m x_i \cdot \sum_{i=1}^m y_i}{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m x_i \right)^2}, \quad (7.-4)$$

$$a = \frac{\sum_{i=1}^m y_i - b \cdot \sum_{i=1}^m x_i}{m}, \quad (7.-5)$$

$$\nu = m - 2. \quad (7.-6)$$

Если полученные значения коэффициентов a и b использовать для вычисления значений y по заданным в таблице 7.-1 значениям аргумента x согласно зависимости (7.-1), то вычисленные значения y обозначают через $Y_1, Y_2, \dots, Y_i, \dots, Y_n$. Разброс значений y_i относительно значений Y_i характеризует величина остаточной дисперсии s_0^2 , которую вычисляют по формуле:

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (y_i - Y_i)^2}{\nu} = \frac{\sum_{i=1}^m y_i^2 - a \cdot \sum_{i=1}^m y_i - b \cdot \sum_{i=1}^m x_i y_i}{\nu} \quad (7.-7)$$

Для того чтобы уравнения (7.-1–7.-2) адекватно описывали экспериментальные данные, необходимо, чтобы остаточная дисперсия s_0^2 не отличалась значимо по критерию Фишера (соотношения 3.-1–3.-4) от дисперсии воспроизводимости (сходимости) величин y_i . Последняя может быть найдена экспериментально или спрогнозирована (см. главу 10) из паспортных данных оборудования.

В свою очередь, дисперсии констант b и a находят по уравнениям:

$$s_b^2 = \frac{ms_0^2}{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m x_i \right)^2}, \quad (7.-8)$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{m} \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 \quad (7.-9)$$

Стандартные отклонения s_b и s_a и величины Δ_b и Δ_a , необходимые для оценки доверительных интервалов констант, рассчитывают по уравнениям:

$$s_b = \sqrt{s_b^2}, \quad (7.-10)$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2}, \quad (7.-11)$$

$$\Delta_b = t(P_2, \nu) \cdot s_b, \quad (7.-12)$$

$$\Delta_a = t(P_2, \nu) \cdot s_a. \quad (7.-13)$$

Коэффициенты a и b должны значимо отличаться от нуля, т.е. превышать, соответственно, величины Δa и Δb .

Уравнению (7.-1) с константами a и b обязательно удовлетворяет точка с координатами \bar{x} и \bar{y} , называемая центром калибровочного графика:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m x_i}{m}, \quad (7.-14)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^m y_i}{m}. \quad (7.-15)$$

Наименьшие отклонения значений y_i от значений Y_i наблюдаются в окрестностях центра графика. Стандартные отклонения s_y и s_x величин y и x , рассчитанных соответственно по уравнениям (7.-1) и (7.-2) исходя из известных значений x и y , определяются с учетом удаления последних от координат центра графика:

$$s_y = \sqrt{s_0^2 \left[\frac{1}{m} + \frac{m(x - \bar{x})^2}{m \cdot \sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i \right)^2} \right]}, \quad (7.-16)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2} \cdot \left[\frac{i}{n_j} + \frac{1}{m} + \frac{m \cdot (\bar{y}_j - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \left[m \cdot \sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i \right)^2 \right]} \right]}, \quad (7.-17)$$

где:

\bar{y}_j – среднее значение;

n_j – число вариант, использованных при определении \bar{y}_j .

При $x = \bar{x}$ и $\bar{y}_j = \bar{y}$

$$s_y = \sqrt{\frac{s_0^2}{m}}, \quad (7.-16a)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2} \left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m} \right]}.$$

С учетом значений s_y и s_x могут быть найдены значения величин Δ_y и Δ_x :

$$\Delta_y = s_y \cdot t(P_2, \nu), \quad (7.-18)$$

$$\Delta_x = s_x \cdot t(P_2, \nu). \quad (7.-19)$$

Значения s_x и Δ_x , найденные при $n_j = 1$, являются характеристиками воспроизводимости (сходимости) аналитической методики, если x – концентрация, а y – функция x .

Обычно результаты статистической обработки по методу наименьших квадратов сводят в таблицу 7.-2.

Таблица 7.-2

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$

ν	\bar{x}	\bar{y}	ba	$t(P_2, \nu)$ при $P_2 = 95\%$	Δ_a	Δ_b	s_0^2	R	s_x при $n_j = 1$ $y_j = \bar{y}$	Δ_x	$\frac{\Delta_{x,y} \cdot 100}{\bar{x}}$	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Примечание 1: если целью экспериментальной работы являлось определение констант b и a , графы 11, 12 и 13 таблицы 7.-2 не заполняются.

Примечание 2: если $y = b \lg x + a$, вычисления, описанные в главе 7, выполняются с использованием уравнений (1.1.-7), (1.1.-6), (1.3.-9–1.3.-12).

Примечание 3: сравнение дисперсий s_0^2 , полученных в разных условиях для двух линейных зависимостей, может быть проведено, как указано в главе 3.

8. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ СХЕМА СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

Традиционно в фармакопейном анализе преобладают методы статистического анализа с фиксированным объемом выборки. Наряду с этим в последние годы все шире применяются методы так называемого последовательного (секвенциального) анализа⁷. Использование этих методов имеет смысл в тех случаях, когда выполнение каждого анализа дорого, трудоемко или отнимает много времени и при этом имеется возможность анализировать результаты последовательно, по мере их поступления.

⁷ См., например, D. Siegmund. Sequential Analysis. Springer-Verlag. 1985.

Частным случаем последовательной схемы является метод проверки с двукратной выборкой. Такой метод применяется в фармакопейном анализе, например, при контроле однородности дозирования: берется первая выборка, и по полученным результатам партия либо проходит, либо бракуется, либо принимается решение взять вторую выборку. Такая схема позволяет сэкономить (в среднем) число наблюдений, необходимое для принятия решения. Еще более экономична последовательная схема в общем виде. По данным⁸ коэффициент выгоды при сопоставлении с традиционными схемами (фиксированный объем выборки) колеблется между двумя и тремя.

⁸ С. А. Айвазян. Теория вероятностей и ее применения. – 1959. – Т. 4. – №1. – с. 87–93.

Последовательный критерий для различения двух простых гипотез:

– H_0 : выборка извлечена из генеральной совокупности $f(x, \mu_0, \sigma)$;

– H_1 : выборка извлечена из генеральной совокупности $f(x, \mu_1, \sigma)$;

предложен Вальдом⁹ (здесь $f(x, \mu, \sigma)$ – функция плотности вероятности нормального распределения). Критическая статистика $\gamma^{(n)}$ (n – число наблюдений) задается в виде:

$$\gamma^{(n)} = \sum_{i=1}^n \ln \frac{f(x_i, \mu_1, \sigma)}{f(x_i, \mu_0, \sigma)}, n = 1, 2 \dots \quad (8.1)$$

⁹ А. Вальд. Последовательный анализ. – М. : Физматгиз. 1960.

Область возможных значений критической статистики разбивается на три (а не на две, как в случае выборок фиксированного объема) части:

1) область принятия гипотезы H_0

$$\gamma^{(n)} \leq \ln \frac{\beta}{1-\alpha}; \quad (8.2)$$

2) область принятия гипотезы H_1

$$\gamma^{(n)} \geq \ln \frac{\beta}{1-\alpha}; \quad (8.2)$$

3) область продолжения наблюдений

$$\ln \frac{\beta}{1-\alpha} < \gamma^{(n)} < \ln \frac{1-\beta}{\alpha} \quad (8.-4)$$

Здесь:

α – погрешность первого рода (вероятность принятия гипотезы H_1 в то время, как на самом деле верна гипотеза H_0);

β – погрешность второго рода (вероятность принятия гипотезы H_0 в то время, как на самом деле верна гипотеза H_1).

Если результаты n испытаний рассматривать как случайную выборку из генеральной совокупности, подчиняющейся нормальному распределению с дисперсией σ^2 (которая предполагается известной из предыдущих экспериментов), то:

$$\gamma^{(n)} = \frac{\mu_1 - \mu_0}{\sigma^2} \cdot \sum x_i + \frac{n}{2\sigma^2} (\mu_0^2 - \mu_1^2) \quad (8.-5)$$

Если значение критической статистики, вычисленное на шаге n , попадает в область 1, то принимается гипотеза H_0 ; если оно попадает в область 2, то принимается гипотеза H_1 ; если значение критической статистики попадает в область 3, то производится еще одно измерение. Доказано, что с вероятностью 1 этот процесс заканчивается принятием одной из двух альтернативных гипотез.

Критерий Вальда является оптимальным в том смысле, что среди всех последовательных критериев он требует минимального среднего числа наблюдений при заданных значениях погрешности первого и второго рода.

На практике вычисления могут быть организованы следующим образом. На график наносят четыре прямые, задаваемые уравнениями, в которых n – номер испытания.

$$T_0 = a_0 + bn, \quad (8.-6a)$$

$$T_1 = a_1 + bn, \quad (8.-6b)$$

$$T'_0 = a'_0 + b'n, \quad (8.-6c)$$

$$T'_1 = a'_1 + b'n. \quad (8.-6d)$$

В этих уравнениях

$$a_0 = a'_0 = \frac{\sigma}{\delta_p} \cdot \ln \frac{\beta}{1 - \frac{\alpha}{2}}, \quad (8.-7a)$$

$$a_1 = a'_1 = \frac{\sigma}{\delta_p} \cdot \ln \frac{1-\beta}{\frac{\alpha}{2}}, \quad (8.-7b)$$

где:

σ – стандартное отклонение метода, которое предполагается известным;

b и b' – верхний и нижний пределы содержания анализируемого вещества в образце;
 $\delta_\mu = |\mu_0 - \mu_1|$ – разность генеральных средних генеральных совокупностей $f(x, \mu_0, \sigma)$
и $f(x, \mu_1, \sigma)$; δ_μ задается экспериментатором и характеризует способность метода различать эти генеральные совокупности.

Прямые (8.-6а–8.-6d) разбивают плоскость на 5 областей (рисунок 8.-1). Область 3 – это область принятия гипотезы H_0 ; области 1 и 5 – области принятия гипотезы H_1 , области 2 и 4 – области продолжения наблюдений. Чем меньше σ и больше δ_μ , тем более узкими являются области 2 и 4 и тем быстрее сходится метод.

Испытания проводятся последовательно. После каждого испытания по оси ординат откладывается накопительная сумма полученных результатов. В зависимости от того, куда попадает очередная точка, принимается одно из трех возможных решений: попадание точки в область 3 означает, что образец выдерживает испытание; попадание в область 1 или 5 означает, что образец не выдерживает испытание; если точка попадает в область 2 или 4, то испытания должны быть продолжены.

Рисунок 8.-1. Практическая организация схемы последовательных испытаний

Более конкретно применение секвенциального анализа описано в главе 9.8.

9. ПРИМЕРЫ

9.1. ВЫЧИСЛЕНИЕ СРЕДНЕГО ЗНАЧЕНИЯ И ДИСПЕРСИИ

При определении содержания стрептоцида в образце линимента были получены следующие данные:

Таблица 9.-1

i	1	2	3	4	5
$x_i, \%$	9,52	9,55	9,83	10,12	10,33

$$n = 5; \nu = n - 1 = 5 - 1 = 4,$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{9,52 + 9,55 + 9,83 + 10,12 + 10,33}{5} = 9,87,$$

$$d_i = |x_i - \bar{x}| = |x_i - 9,87|,$$

т.е.

$$d_1 = |9,52 - 9,87| = 0,35$$

и т.д.