

# IMPLEMENTACIJA AVTOMATIZIRANEGA TESTNEGA SISTEMA TESTIRANJA PIROGENOSTI V BOLNIŠNIČNI PROIZVODNJI PARENTERALNIH RAZTOPIN

## THE IMPLEMENTATION OF THE AUTOMATIC TEST SYSTEM FOR PYROGENICITY TESTING IN HOSPITAL PARENTERAL PRODUCTION

AVTOR / AUTHOR:

Mateja Tršan<sup>1</sup>, mag. farm.,  
spec. iz preizkušanja zdravil  
prof. dr. Stanko Srčič<sup>2</sup>, mag. farm.

<sup>1</sup> Univerzitetni klinični center Ljubljana, Lekarna  
Zaloška 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Fakulteta za Farmacijo Univerze v Ljubljani  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
mateja.trsan@kclj.si

### POVZETEK

Izdelava parenteralnih raztopin v bolnišničnem merilu pomeni znanstveni in strokovni izziv. Ker v bolnišnici izdelane proizvode potrebujemo hitro ali celo takoj in ker imajo tudi bistveno krajši čas stabilnosti kot industrijsko izdelani, je hitrost ugotavljanja skladnosti izdelanih proizvodov s farmakopejskimi zahtevami ključnega pomena. Sterilnost in apirogenost tako izdelanih končnih proizvodov zagotovimo le z validiranimi proizvodnimi procesi in striktno implementacijo dobre proizvodne prakse. V ta namen smo vpeljali in validirali hitri prenosni testni sistem, ki zagotavlja kvantitativne rezultate v 15 minutah. Kvantitativne rezultate dobimo z uporabo predhodno napolnjenih testnih ploščic za enkratno uporabo in ročnim spektrofotometrom. Ker je sistem prenosen, ga lahko uporabimo že na mestu vzorčenja.

### KLJUČNE BESEDE:

parenteralne raztopine, (a)pirogenost, bakterijski endotoksini, endotoksinska meja

### ABSTRACT

Production of parental solutions from the hospital's point of view means a scientific and professional challenge. The demand for the in-house parenteral products is high and requires a fast or even immediate response. These products have lower stability and shorter shelf life compared to industrial products. The products must comply with all pharmacopoeian standards. That can only be performed in the production process, which ensures sterility and apyrogenicity of the final parenteral products. However, it is achievable with validated, well-designed, and constantly controlled production process only. These processes must fully implement the principles of good manufacturing practices. In this regard, we have implemented and validated rapid point-of-use test system that provides quantitative results within 15 minutes. The test system (PTS) utilizes disposable cartridges that are pre-loaded with reagents and a portable and handheld reader to provide quantitative endotoxin amounts. Because of its portability, the PTS allows the testing to be performed at the point of sample collection.

### KEY WORDS:

parenteral solutions, (a)pyrogenicity, bacterial endotoxins, endotoxin limit



# 1 UVOD

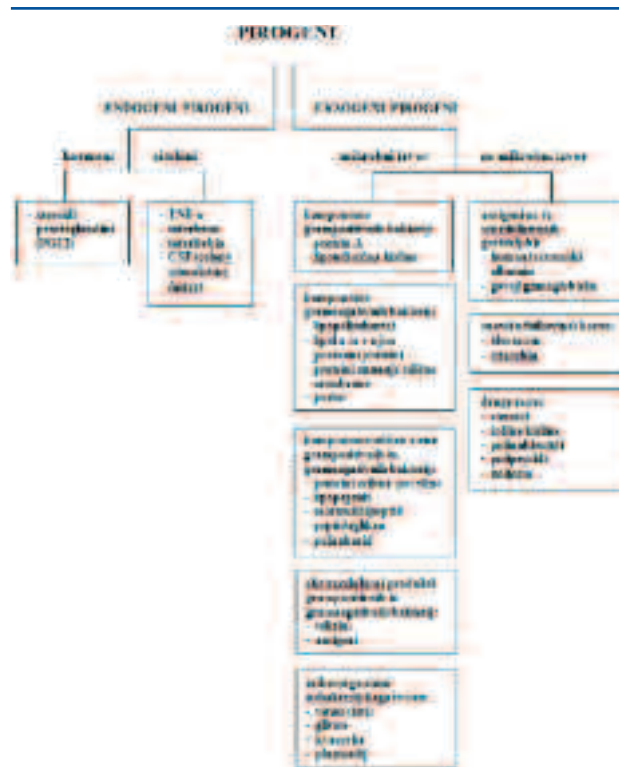
Parenteralne farmacevtske oblike so sterilne oblike za aplikacijo z injiciranjem, infundiranjem ali implantiranjem v človeško ali živalsko telo. Razlikujemo več vrst parenteralnih farmacevtskih oblik: injekcije, intravenske infuzije, koncentrate za pripravo raztopin za injiciranje ali intravensko infundiranje, praške za pripravo injekcij ali intravenskih infuzij in implantate. Izdelava sterilnih farmacevtskih proizvodov v bolnišničnem merilu pomeni izjemen znanstveni in strokovni izziv. V industrijskem merilu, kjer je proizvodnja sterilnih zdravil strogo kontrolirana in izvedena v optimalnih in validiranih okoljih, je praviloma vedno dovolj časa za izvedbo vseh končnih kontrol – med njimi tudi sterilnosti in apirogenosti, je pa možno tudi sproščanje na osnovi celotne dokumentacije proizvodnje (t. i. parametrično sproščanje) in ob pogoju, da je celoten postopek validiran. Danes moramo namreč testirati mikrobiološko kakovost oziroma sterilnost in apirogenost pri vseh parenteralnih izdelkih kot končnih farmacevtskih oblikah (1–3).

Ker v bolnišnici izdelane proizvode potrebujemo hitro (ali celo takoj) in ker imajo tudi bistveno krajši čas stabilnosti od industrijsko izdelanih, je hitrost ugotavljanja skladnosti z zahtevami ključnega pomena. Zato je uvedba avtomatizirane metode, ki omogoča hitro ugotavljanje kakovosti, izjemen prispevek h kakovosti in učinkovitosti procesa izdelave ter k varnosti izdelanih zdravil in posredno uporabnikov – pacientov.

Dolgotrajni končni testi za bolnišnično okolje niso optimalni, zato je toliko bolj pomembno zagotoviti absolutno optimalne pogoje izdelave. Končni cilj je kontrola oziroma testiranje vseh v proces vstopajočih snovi: sestavin izdelka (učinkovin, vode za injekcije, ostalih pomožnih snovi), procesne opreme (filtrov, laboratorijskega materiala) ter ovojnine (zapiral, plastenek, stekleničk).

## 1.1. PIROGENOST IN PIROGENI

Pirogeni so snovi, ki, kadar pridejo v krvni obtok, v manjših koncentracijah povzročijo le dvig telesne temperature, pri večjih pa tudi povečajo prepustnost žilja, kar ima lahko za posledico šok ter nadalje smrt. Pirogeni aktivirajo tudi koagulacijski sistem, stimulirajo imunski sistem, povzročijo motnje metabolizma ogljikovih hidratov in maščob, povzročijo agregacijo trombocitov ter aktivacijo komplemента. Apirogenost pomeni odsotnost pirogenov (1).



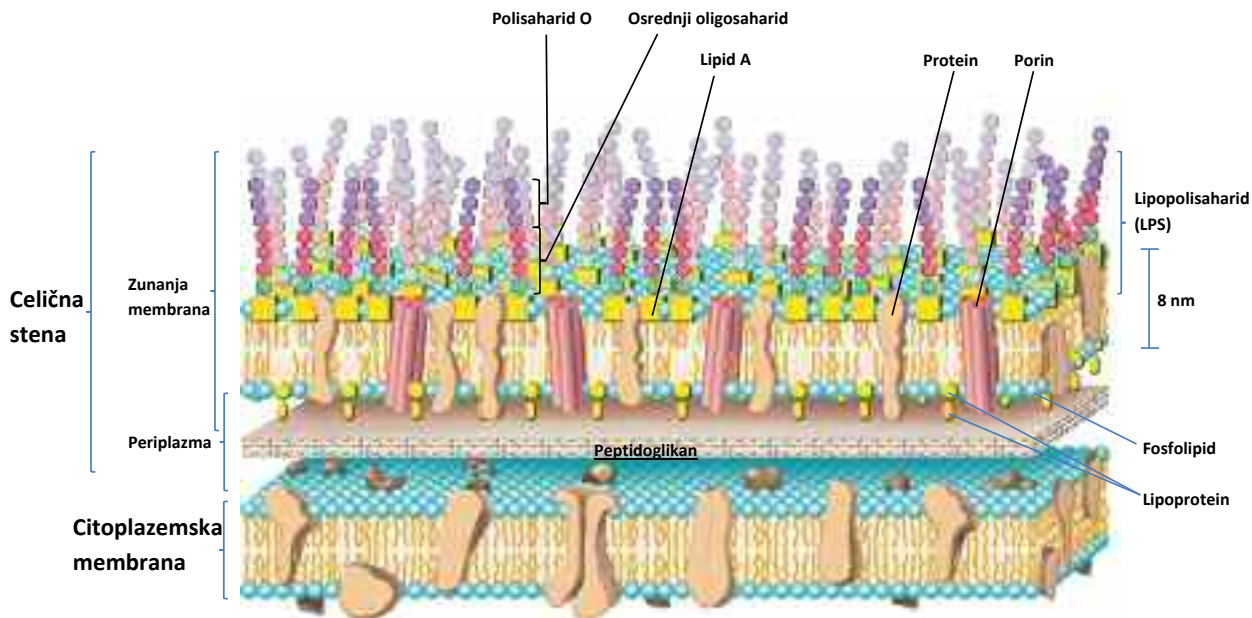
Slika 1: Razdelitev in izvor pirogenov (1).

Figure 1: Classification and origin of pyrogens (1).

Pirogene snovi splošno delimo na endogene in eksogene. Endogeni pirogeni so tisti, ki nastanejo v telesu pri vnetnih procesih, koagulaciji in pri zvišanju telesne temperature. Eksogeni pa ne nastajajo v telesu in ob vnosu vanj, na primer pri parenteralnem vnosu, infekciji, povzročijo zvišanje telesne temperature. Ti pirogeni so snovi bakterijskega, virusnega, glivičnega ali kemijskega izvora, kot je prikazano na sliki 1.

Najpogosteje dokazujemo prisotnost pirogenov, ki izhajajo iz po Gramu negativnih bakterij. Razlog je v tem, da so to v naravi pogoste, potencialno toksične ter zelo stabilne snovi in so zato problematične zlasti za tiste parenteralne farmacevtske oblike, kjer gre za direkten vnos v krvni obtok (4).

Po Gramu negativna bakterija je namreč pred vplivi okolja zaščitena z dvojno celično membrano. V njenem zunanjem sloju so lipopolisaharidi, ki skrbijo za strukturno integriteto bakterijske celice ter imajo fiziološko in imunološko vlogo ter vlogo pri transportu hranilnih snovi. Zato so ključnega pomena za njeno preživetje (1).



Slika 2: Prikaz bakterijske celične stene po Gramu negativne bakterije z lipopolisaharidnim endotoksinskim delom (5).  
Figure 2: Gram negative bacterial cell wall with the lipopolysaccharide endotoxine part (5).

Lipopolisaharidi, ki predstavljajo 45 % komponent zunanje membrane, se med bakterijami razlikujejo ter vplivajo na njihovo patogenost. Vsi lipopolisaharidi imajo enako osnovno zgradbo, in sicer je to lipid A, na katerega sta kovalentno vezana oligosaharidna sredica in polisaharidni O-antigen (slika 2). Kakšna bo aktivnost lipopolisaharida, pa je odvisno od strukture njegove molekule. Lipid A je tisti del lipopolisaharida, ki je odgovoren za njegovo biološko aktivnost (na priemer povišana telesna temperatura, povišano število levkocitov v krvi, intravaskularne koagulacije, nekroze) in je tudi tisti del molekule, ki se med bakterijami razlikuje. Zaradi tega se posledično razlikujejo tudi biološke aktivnosti lipopolisaharidov med bakterijami.

## 1.2. TESTIRANJE PIROGENOSTI

Trenutno veljavna izdaja Evropske farmakopeje predpisuje za testiranje pirogenosti tri metode: Pirogene snovi – *Pyrogens* (2.6.8), Bakterijski endotoksini – *Bacterial endotoxins* (2.6.14) in *Monocyte Activation Test* (2.6.30).

### 1.2.1. PIROGENE SNOVI

Test na pirogene snovi je *in vivo* test, pri katerem merimo dvig telesne temperature kunccev, ki ga povzroči intravenska aplikacija testirane raztopine. Ker se kunci na prisotne pirogene snovi odzovejo podobno kot ljudje, lahko s tem te-

stom dokazujemo prisotnost vseh vrst pirogenov (6). Izvedba testa, interpretacija rezultatov in pogoji za ponavljanje testa so opisani v splošni monografiji evropske farmakopeje (Ph. Eur.) v poglavju 2.6.8 *Pyrogens* (7). Priprava testne raztopine in testni odmerek učinkovine pa sta predpisana v posamezni monografiji učinkovine za farmacevtsko uporabo.

### 1.2.2. BAKTERIJSKI ENDOTOKSINI

Preskus na bakterijske endotoksine (BET, *bacterial endotoxins*) je *in vitro* test, s katerim dokazujemo le prisotnost bakterijskih endotoksinov, ne pa tudi ostalih pirogenov. Smernice za uporabo tega testa so podane v poglavju evropske farmakopeje 5.1.10 *Guidelines for using the test for bacterial endotoxins*. Evropska farmakopeja predpisuje tri različne tehnike, gelsko, turbidimetrično in kromogeno, za izvedbo testa pa 6 različnih metod:

- metoda A: gelska metoda – limitni test,
- metoda B: gelska metoda – semikvantitativni test,
- metoda C: turbidimetrična kinetična metoda,
- metoda D: kromogena kinetična metoda,
- metoda E: kromogena metoda končnih točk,
- metoda F: turbidimetrična metoda končnih točk (6–9).

Osnova omenjenih tehnik oziroma metod je zaporedje encimskih reakcij, ki se aktivirajo v prisotnosti bakterijskih endotoksinov (slika 3). Pri gelskih metodah je rezultat teh

## Princip BET



Slika 3: Shematska predstavitev principov reakcij pri posameznih tehnikah BET (1).

Figure 3: Schematic representation of bacterial endotoxins test principles (1).

reakcij gel, pri turbidimetričnih metodah pa testne raztopine postanejo motne in rezultate zato določamo s fotometrijo. Pri kromogenih metodah merimo spremembo absorbance zaradi nastanka kromoforne spojine, ki obarva testno raztopino. Reagent za kromogeno metodo je sestavljen iz lizata krvnih celic podkvaste rakovice (*Limulus polyphemus*) in kromogenega substrata. Substrat je kratek peptid, ki ima z amidno vezjo vezan *para*-nitroanilin in je v segmentu, kjer koagulaza cepi peptidno vez, strukturno podoben molekuli koagulogena. Ob prisotnosti endotoksina koagulaza cepi vez v kromogenem substratu, zaradi česar se sprosti *para*-nitroanilin, ki zmes obarva rumeno. Fotometrično merimo porast absorbance zaradi sproščenega *para*-nitroanilina. Intenziteta nastale barve je sorazmerna količini endotoksinov v vzorcu.

### 1.2.3. TEST AKTIVACIJE MONOCITOV

Test aktivacije monocitov (MAT, *Monocyte Activation Test*) je *in vitro* test, s katerim detektiramo in določamo snovi, ki aktivirajo človeške monocite ter povzročijo sproščanje endogenih mediatorjev – proznetnih citokinov, kot so na primer dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) in interleukin-6 (IL-6). Osnovni princip je torej *in vitro* aktivacija človeških monocitov namesto živalskih. Monociti so lahko pridobljeni iz človeške krvi ali pa s pomočjo celične linije. S tem testom lahko določimo tudi vse vrste neendotoksinov pirogenov, torej tistih, ki izvirajo iz po Gramu pozitivnih bakterij, gliv in virusov. Evropska farmakopeja predpisuje tri različne metode MAT:

- metoda A: kvantitativni test,
- metoda B: semikvantitativni test,
- metoda C: primerjalni test (10).

### 1.2.4. PRIMERJAVA METOD

Evropska farmakopeja navaja, da lahko izvedemo *in vivo* test na pirogene le v primeru, ko BET ali MAT ne moremo validirati. Metodo izberemo v odvisnosti od pričakovane vrste pirogenov v vzorcu. V primeru izbire BET moramo narediti še oceno tveganja zaradi možnosti, da so v vzorcu prisotni tudi neendotoksinov pirogeni. V primeru velikega tveganje ima prednost metoda MAT.

Pirogeni odziv v organizmu je odvisen od količine v telo vnesenih pirogenov na kilogram telesne mase, pri BET in MAT pa je reakcija povezana s koncentracijo endotoksinov oziroma kontaminantov v testni raztopini. Pri prvem testu je predpisan testni odmerek, na katerega se kunci ne smejo odzvati s pirogeno reakcijo, pri BET in MAT pa je predpisana endotoksinovska meja (EL, *Endotoxin Limit*) (8) oziroma mejna koncentracija kontaminanta (CLC, *Contaminant Limit Concentration*) (9). To sta maksimalni dovoljeni količini endotoksinov oziroma pirogenov v izdelku, ki ob aplikaciji največjega dovoljenega odmerka zdravila še ne bosta sprožili pirogene reakcije. EL je podana v mednarodnih oziroma endotoksinovskih enotah (tj. EU) na mililiter ali gram izdelka, CLC pa v endotoksinovskih ekvivalentih (tj. EEU). Meje so pogojene z mestom aplikacije in maksimalnim priporočljivim odmerkom učinkovine.

Preglednica 1: Primerjava metod za testiranje pirogenosti.

Table 1: Comparison of methods for pyrogen testing.

	<b>Pirogeni test Ph. Eur.: 2.6.8</b>	<b>BET Ph. Eur.: 2.6.14</b>	<b>MAT Ph. Eur.: 2.6.30</b>
<b>Testni sistem</b>	<i>In vivo</i> Kunec	<i>Ex vivo/in vitro</i> Podkvasta rakovica	<i>Ex vivo/in vitro</i> Človeška kri, celična linija
<b>Tip</b>	Limitni test	Limitni test Kvantitativni test	Limitni test Kvantitativni test
<b>Specifičnost</b>	Vsi pirogeni	Endotoksini	Vsi pirogeni
<b>Meja detekcije</b>	5 EU/kg	0,005 EU/ml	0,04 EU/ml
<b>Uporabnost</b>	Farmacevtski izdelki Biološka zdravila Medicinski pripomočki	Farmacevtski izdelki Biološka zdravila (omejitve) Krvni preparati (omejitve) Medicinski pripomočki	Farmacevtski izdelki Biološka zdravila Krvni preparati Medicinski pripomočki

Kvantitativne metode imajo prednost zlasti pri kontroli kakovosti vhodnih surovin in vode ter v medprocesnih kontrolah, kjer je zaželeno rezultate kvantificirati. Večinoma omogočajo tudi avtomatizacijo in izpise ter obdelavo rezultatov v elektronski obliki (1). Praviloma so bolj občutljive, kar nam daje več možnosti pri pripravi vzorca. Z redčenjem vzorcev namreč zmanjšamo vpliv vzorca na potek encimske reakcije pri testu (8). Imajo pa tudi pomanjkljivosti, ker lahko reakcijo zavirajo podobni dejavniki kot pri gelski metodi. Pri fotometričnih metodah se lahko pojavijo še dodatni moteči dejavniki: pri turbidimetrični kinetični metodi reakcijo motijo motni vzorci, kot so emulzije in vzorci z velikimi koncentracijami proteinov, kjer molekule agregirajo. Pri kromogeni metodi, kjer spremljamo spremembo intenzitete barve, pa izvedbo testa motijo obarvani vzorci (8, 11).

## 2 NAMEN

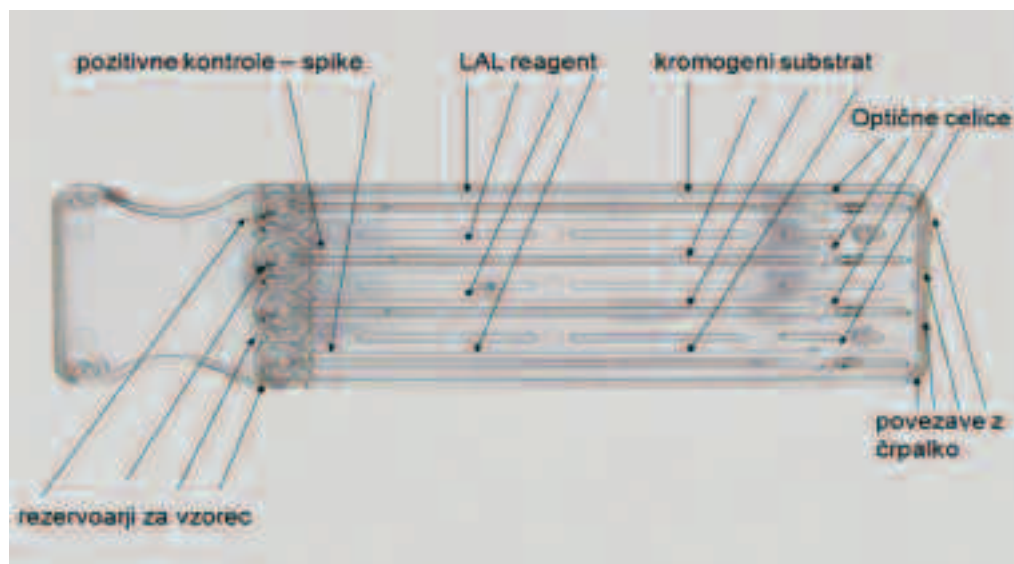
Namen našega raziskovalnega dela je bil poiskati, optimizirati, validirati in implementirati za naše specifične razmere oziroma potrebe najprimernejšo metodo za testiranje apirogenosti parenteralnih galenskih izdelkov v Lekarni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKC Lj). Pri trenutni bolnišnični proizvodnji je zaradi izredno velikega števila

majhnih serij različnih izdelkov tudi veliko omejitvenih dejavnikov. Najpomembnejši je časovni dejavnik, ker se morajo izdelki zaradi kratkih rokov uporabnosti pogosto sprostiti v uporabo že pred pridobitvijo vseh za sproščanje potrebnih rezultatov, ko gre za implementacijo klasičnih izvedb. Enako velja tudi za alternativno pošiljanje vzorcev k zunanjim pogodbenim laboratorijem. Dodatno omejujoči dejavnik je omejenost z ustreznimi prostorskimi in človeškimi kapacitetami. Klasične izvedbe določanja bakterijskih endotoksinov namreč zahtevajo izvedbo v čistih prostorih v komorah z laminarnim pretokom zraka, teh pa v bolnišnični lekarni ni dovolj.

## 3 MATERIALI IN METODE

Osnova uporabljene metode je kromogena kinetična metoda. Avtomatizirani testni sistem (ENDOSAFE®-PTS™, Charles River Laboratories, Francija) sestavljajo prenosni instrument z inkubirano črpalko, spektrofotometrom in integriranim programom za izračun in shranjevanje podatkov. Aparatura je oblikovana tako, da zadosti farmakopejskim predpisom za kromogeno kinetično metodo oziroma za fotometrične metode (2.6.14. *Bacterial Endotoxins*). Za izvedbo testa uporabljamo testne ploščice, ki imajo nanese





Slika 4: Zgradba testne ploščice – Cartridge ENDOSAFE®-PTS™ (10).  
Figure 4: Test Cartridge scheme (10).

vse potrebne reagente v suhi obliki. Vsaka ploščica (PTS Cartridges: FDA 0,005 EU/ml k.š.PTS20005F, PTS Cartridges FDA 0,01 EU/ml k.š.PTS2001F, PTS Cartridges FDA 0,05 EU/ml; k.š.PTS2005F PTS Cartridges FDA 0,1 EU/ml; k.š.PTS201F Charles River Laboratories) že vsebuje določeno količino reagenta LAL (*Limulus Amebocyte Ly-sate*), kromogeni substrat ter kontrolni endotoksinski standard. Ploščica ima štiri mesta (*sample channels*) za vzorec in dve mesti za pozitivno kontrolo (*spike channels*) (slika 4).

Test izvedemo z nanosom vzorca v vsa štiri vzorčna mesta. Vzorec nato črpalka potegne v testne kanalčke. V prvih štirih minutah testa pride na ploščici do inkubacije vzorca z reagentom LAL in kromogenim substratom, nato pa merimo intenziteto nastale barve oziroma porast absorbance (pri 385–410 nm) zaradi sproščenega rumenega *para*-nitroanilina. S pomočjo integriranega programa na osnovi arhivirane umeritvene krivulje kvantitativno določimo vsebnost endotoksinov v vzorcu. Ploščica je oblikovana tako, da istočasno avtomatsko izvedemo dvojno pozitivno kontrolo. Pozitivno kontrolo izvedemo zato, da dokažemo, da sam vzorec ne vpliva na reakcijo.

Validacijo metode za določen izdelek izvedemo s testom zaviranja in pospeševanja na treh serijah, s čimer dokažemo, da izdelek oziroma sestavine ne vplivajo na encimsko reakcijo. Slednje dejansko pomeni, da moramo pri pozitivni kontroli, kjer določamo vsebnost endotoksinskega standarda, kljub prisotnosti testnega vzorca, določiti med 50 in 200 % deklarirane vrednosti standarda.

Obdelava rezultatov je avtomatizirana, čitalec PTS™ meri reakcijski čas v vsakem kanalu ploščice posebej. Za vsako serijo ploščic je določena umeritvena krivulja, ki v danem območju prikazuje korelacijo med logaritmom reakcijskega časa in logaritmom koncentracije endotoksinskega standarda. Rezultate dobimo z interpolacijo standardne krivulje z uporabo reakcijskega časa.

Ostala uporabljena oprema in materiali za izvedbo testiranja so mešalo z nastavkom za epruvete »vortex« (IKA® MS 3 basic), pH-ionometer (Mettler Toledo SevenExcellence™ pH/Conductivity meter), polavtomatska pipeta Multipette® plus (Eppendorf), apirogeni pipetni nastavki Combitips Biopur 1,0 ml in 0,5 ml (Eppendorf), apirogena in sterilna epruveta 13 × 100 (Charles River Laboratories, ZDA), apirogena prečiščena voda (LAL Reagent Water; Charles River Laboratories, ZDA) in Parafilm M (Pechiney, ZDA).

Za začetno testiranje smo uporabili parenteralne izdelke našega galenskega laboratorija, kjer smo pričakovali enostaven prehod na nov način testiranja glede na prej izvajani test pri pogodbenem izvajalcu. To so hkrati tudi v laboratoriju najpogosteje izdelane sterilne parenteralne raztopine: redestilirana voda, 5-odstotna glukoza, 0,9-odstotni NaCl, 5-odstotna glukoza v 0,9-odstotnem NaCl, 5-odstotna glukoza v ¼ Ringerjevi raztopini, Ringerjeva raztopina, 1 M kalijev klorid, 1 M kalijev fosfat, 1 M kalcijev klorid in 1 M magnezijev sulfat. Ker so ti izdelki standardne parenteralne raztopine, smo imeli predhodno že določeno oziroma izračunano endotoksinsko mejo (EL). Najprej smo glede na

EL določili maksimalno razredčitev vzorca, pri kateri še lahko pri ploščici določene občutljivosti dobimo veljaven rezultat. Če smo želeli, na primer pri izdelku z  $EL \leq 0,250$  EU/ml z namenom zmanjšanja vpliva vzorca na test, vzorec redčiti 1 : 100, smo morali uporabiti ploščico z občutljivostjo vsaj 0,001 EU/ml. Če bi uporabili testno ploščico z manjšo občutljivostjo, na primer le do 0,01 EU/ml, bi ob upoštevanju redčitve dobili rezultat, da je v vzorcu  $\leq 1$  EU/ml, kar pa je več od predpisane EL. Po določitvi maksimalno veljavne razredčitve vzorcev (MVD, *Maximum Valid Dilution*) smo za posamezen izdelek predpisali testne ploščice primerne občutljivosti. Testni postopek smo najprej preizkusili na izdelkih direktno, brez redčenja, vendar smo zadovoljive rezultate dobili le pri redestilirani vodi in fiziološki raztopini. Z redčenjem namreč najenostavneje zmanjšamo vpliv sestavin preiskovanega vzorca in dosežemo vrednosti pozitivnih kontrol blizu 100 % deklarirane vrednosti standarda. Če je vrednost pozitivne kontrole (*spike recovery*) manjša kot 100 % vrednosti, pomeni, da sestavine vzorca reakcijo zavirajo oziroma pri reakciji ne določimo celotne količine prisotnega kontrolnega standarda. Če so vrednosti večje od 100 % vrednosti standarda, pomeni, da sestavine izdelka reakcijo lažno povečajo.

Za mešanice raztopin glukoze je bilo za doseganje zadovoljivih rezultatov primerno redčenje 1 : 5, pri koncentriranih elektrolitskih raztopinah pa je bilo potrebno večje, in sicer od 1 : 20 do 1 : 400.

Na podlagi originalnih navodil proizvajalca (1), Evropske farmakopeje (7, 8) in drugih priporočil oziroma smernic (10–12) smo pripravili navodila za kvalifikacijo analitika, kalibracijo aparature in validacijo postopka. Postopek smo nato za vsak galenski izdelek validirali na treh serijah (preglednica 2).

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V obdobju štirih let (od 1. 1. 2011 do 31. 12. 2014) smo analizirali več kot 2895 serij oziroma 8685 vzorcev parenteralnih galenskih izdelkov. Testirali smo 133 različnih parenteralnih galenskih izdelkov ter razvili in validirali 33 analizi postopkov, ki smo jih nato ob upoštevanju različnih vsebnosti sestavin v izdelku še dodatno prilagodili posameznim izdelkom. Prilagodili smo na primer redčenje vzorca

in izbiro občutljivosti testne ploščice. Del postopkov prikazuje preglednica 2.

Preglednica vsebuje v prvem stolpcu ime izdelka, v naslednjih stolpcih pa predpis za pripravo vzorca in redčenje, podatke o optimalni testni ploščici (Cartridge), pričakovani rezultat za priporočeno redčitev in testno ploščico, MVD za posamezne testne ploščice in EL za posamezen izdelek. Za večino izdelkov so bile EL že predpisane, v primeru novega izdelka pa smo jo morali najprej določiti. Če so bile meje za vsebnost bakterijskih endotoksinov predpisane v farmakopejski monografiji uporabljene učinkovine oziroma snovi za farmacevtsko uporabo, smo lahko EL za končni izdelek določili glede na vsebnost te substance v izdelku. V primeru nove učinkovine oziroma če v monografiji meja ni bila predpisana, pa smo EL za končni izdelek določili s pomočjo podatkov o največjem sprejemljivem odmerku endotoksina na kilogram telesne mase, ki jo bolnik lahko sprejme brez neželenih posledic. Dovoljena meja je odvisna od načina aplikacije ter vrednosti maksimalnega priporočljivega odmerka zdravila na kilogram telesne mase na uro (8).

Test smo vedno izvedli na treh vzorcih oziroma enotah iste serije. Prvi vzorec smo vzeli na začetku, drugega na sredini in tretjega na konca faze polnjenja serije izdelka. Na začetku smo vzorce pripravljali tako, da smo vse tri vzorce iste serije najprej združili v tako imenovani zbirni vzorec (*pool*) in jih v nadaljevanju testirali skupaj, nato pa smo postopek poenostavili in pripravo zbirnega vzorca in prve razredčitve združili v en korak. To pomeni, da nismo združili celotne vsebine treh embalažnih enot, ampak smo iz posamezne enote odvzeli in združili le v postopku predpisano količino vzorca iz posamezne steklenice in ji dodali ustrezno količino vode (preglednica 2). Redčenje smo izvajali postopoma s koraki 1 : 10. Večinoma so zadostovali trije koraki, razen pri polproizvodu žveplova(VI) kislina (0,1 M), kjer smo potrebovali skupno 5 korakov.

Za biološke metode velja farmakopejski predpis, da mora biti variabilnost vzorca in endotoksinskega standarda manjša od 25 % ter vrednost pozitivne kontrole med 50 in 200 % deklarirane vrednosti. Za naše ciljne vrednosti smo si postavili strožje meje, in sicer morata biti variabilnost paralelnih meritev vzorca (Sample Rxn Time CV) in variabilnost pozitivnih kontrol (Spike RxnTime CV) znotraj 5 % ter da mora biti vrednost pozitivne kontrole (Spike Recovery) med 75 in 125 % deklarirane vrednosti standarda. Rezultati so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 2: Del preglednice analiznih postopkov s ključnimi podatki za izvedbo testa.  
Table 2: Part of the spreadsheet analytical processes with the key information for the test.

IZDELEK	Priprava vzorcev in redčitve od I. do V.		Redčitev za vpis v PTS	Testna ploščica	Pričakovani rezultat (za izbrano redčitev in ploščico)	MVD za ploščico 0,005	MVD za ploščico 0,01	MVD za ploščico 0,05	MVD za ploščico 0,1	EL
<b>Intraokularna raztopina</b>	I (1 : 5) 3 x 0,2 ml vz + 2,4 ml vode		5	0,05	0,25	50	25	5	2,5	0,25 EU/ml
<b>Kalcijev klorid 1 M</b>	I (1 : 10) 3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 100) 0,5 ml I + 4,5 ml	400	0,01	4	5880	2940	588	294	29,4 EU/ml = 0,2 EU/mg
<b>Kalcijev klorid 10 % (0,68 M)</b>	I (1 : 10) 3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 100) 0,5 ml I + 4,5 ml	400	0,05	20	4000	2000	400	200	20 EU/ml = 0,2 EU/mg
<b>Kalijev fosfat 1 M</b>	I (1 : 10) 3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 100) 0,5 ml I + 4,5 ml	100	0,05	5	21120	10560	2112	1056	105,6 EU/ml = 1,1 EU/mg
<b>Kalijev fosfat 1 M 40 ml, NaCl 0,9 % 60 ml</b>	I (1 : 10) 3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 40) 1 ml I + 3 ml	40	0,005	0,2	500	250	50	25	0,25 EU/ml
<b>Kalijev klorid 1 M</b>	0,5 % 3 x 0,1 ml vz + 4,2 ml vode	I (1 : 10) 0,5 ml I + 4,5 ml	20	0,05	1	600	300	60	30	3,0 EU/ml (0,5 % razt)
<b>Kalijev klorid 1 M 40 ml, NaCl 0,9 % 60 ml</b>	I (1 : 10) 3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 50) 1 ml I + 4 ml	50	0,005	0,25	50	25	5	2,5	0,25 EU/ml
<b>Kalijev klorid 2 M</b>	0,5 % 3 x 0,05 ml vz + 4,35 ml	I (1 : 10) 0,5 ml I + 4,5 ml	20	0,05	1	600	300	60	30	3,0 EU/ml (0,5 % razt)
<b>Kalijev klorid 3 %</b>	0,5% 3 x 0,2 ml + 3,0 ml vode	I (1 : 10) 0,5 ml I + 4,5 ml	20	0,05	1	600	300	60	30	3,0 EU/ml (0,5 % razt)
<b>Kardiopegika koncentrat</b>	I (1 : 5) 3 x 0,2 ml vz + 2,4 ml vode		5	0,01	0,05	50	25	5	2,5	0,25 EU/ml
<b>Lidokainijev klorid 0,66 %</b>	I (1 : 10) 3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 70) 0,5 ml I + 3,0 ml	70	0,01	0,7	1450	726	145	72,6	7,26 EU/ml = 1,1 EU/mg



IZDELEK	Priprava vzorcev in redčitve od I. do V.				Redčitev za vpis v PTS	Testna ploščica	Pričakovani rezultat (za izbrano redčitev in ploščico)	MVD za ploščico 0,005	MVD za ploščico 0,01	MVD za ploščico 0,05	MVD za ploščico 0,1	EL
	I (1 : 5)	II (1 : 50)	III (1 : 100)	IV (1 : 1000)								
<b>Lidokainijev klorid 1 %</b>	3 x 0,2 ml vz + 2,4 ml vode	II (1 : 50) 0,4 ml I +3,6 ml			50	0,05	2,5	2200	1100	220	110	11 EU/ml = 1,1 EU/mg
<b>Lidokainijev klorid 2 %</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 100) 0,5 ml I +4,5 ml			100	0,05	5	4400	2200	440	220	22 EU/ml = 1,1 EU/mg
<b>Lidokainijev klorid 4 %</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 100) 0,5 ml I +4,5 ml	III (1 : 200) 2 ml II+2 ml		200	0,05	10	8800	4400	880	440	44 EU/ml = 1,1 EU/mg
<b>Lidokainijev klorid 10 %</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 50) 0,4 ml I +3,6 ml	III (1 : 400) 1 ml II +3 ml		400	0,05	20	22000	1100	2200	110	110 EU/ml = 1,1 EU/mg
<b>Magnezijev klorid 0,2 M</b>	3 x 0,2 ml vz + 2,4 ml vode				10	0,005	0,05	10	5	1	/	0,057 EU/ml = 3 EU/g
<b>Magnezijev klorid 1 M</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 25) 2 ml I +3 ml			25	0,01	0,25	50	20	5	2	0,2856 EU/ml = 3 EU/g
<b>Magnezijev sulfat 1 M</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 100) 0,5 ml I+4,5ml	III (1 : 200) 2 ml II +2 ml		200	0,05	10	4420	2210	442	221	22,5 EU/ml = 0,09EU/mg
<b>Magnezijev sulfat 2 M</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1 : 100) 0,5 ml I+4,5ml	III (1 : 400) 1 ml II +3 ml		400	0,05	20	4000	2000	400	/	45 EU/ml = 0,09EU/mg
<b>Manitol 10 %</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode	II (1:20) 2 ml I+2ml			20	0,01	0,2	80	40	8	4	0,4 EU/ml = 4 EU/g
<b>Manitol 20 %</b>	3 x 1 ml vz + 3ml ml vode	II (1 : 20) 0,3 ml I +2,7 ml			20	0,01	0,2	160	80	16	8	0,8 EU/ml = 4 EU/g
<b>Žveplova(VI) kislina 0,1 M</b>	3 x 0,1 ml vz + 2,7 ml vode II (1 : 100) 0,5 ml I+4,5 ml vode	III (1 : 1000) 0,5 ml II+4,5ml IV (1 : 10000) 0,5 ml III+4,5 ml	V (1 : 40000) 1 ml IV+3 ml		40000	0,05	2000	-	-	186660	/	9333 EU/ml

Preglednica 3: Preglednica vseh testiranih vzorcev v Lekarni UKC LJ v obdobju 1. 1. 2011 do 31. 12. 2014.

Table 3: Table of all tested samples in the UKC Pharmacy during the period 1. 1. 2011 to 31. 12. 2014.

Vzorec	Število serij	Uporabljene redčitve	Spike Rxn Time CV [%]	Spike Recovery [%]	Sample Rxn Time CV [%]	Rezultati	EL za izdelke [EU/ml]	Predpis za substanco in/ali izdelek (Ph. Eur, USP, interno)
GLUKOZA Z ELEKTROLITI	757	1 : 5-1 : 10	4,15	91,46	4,36	< 0,025 – < 0,250	0,025 - 0,25	0,25 EU/ml (5-odstotna razt.)
REDESTILIRANA VODA	615	1	3,86	96,22	7,88	< 0,005 – < 0,050	0,05	0,25 EU/ml; 0,05 EU/ml (voda LAL)
NATRIJEV KLORID 0.9%	390	1	3,54	84,82	/	< 0,050 – < 0,100	0,25	0,25 EU/ml
NATRIJEV CITRAT	268	1 : 40-1 : 300	4,21	93,79	11,67	< 0,400 – < 3,00	5,6	5,60 EU/ml
LIDOKAINIJEV KLORID	112	1 : 70-1 : 400	5,00	95,55	9,70	< 0,700 – < 5,00	7,26 - 110	1,10 EU/mg
KALCIJEV KLORID	104	1 : 400	2,70	84,36	/	< 4,00 – < 20,0	20 -29,4	0,20 EU/mg
NATRIJEV KLORID; koncentraciji	95	1	3,62	86,89	/	< 0,100	0,25	0,25 EU/ml (0,9-odstotna razt)
GLUKOZA	90	1 : 5	4,39	87,73	14,30	< 0,025 – < 0,250	0,025 - 0,25	0,25 EU/ml (5-odstotna razt)
MANITOL	54	1 : 20	4,30	89,71	3,55	< 0,200	0,4 - 0,8	4 EU/g
KALCIJEV KLORID	53	1 : 20-1 : 50	3,26	97,40	1,60	< 0,250 – < 1,00	0,25 - 3,0	3 EU/ml (0,5-odstotna razt)
KALCIJEV FOSFAT	43	1 : 40-1 : 100	4,27	82,58	2,40	< 0,200 – < 5,00	0,25 -105,6	1,10 EU/mg
NATRIJEV HEPARINAT	40	1-1 : 10	3,81	110,08	0,93	< 0,010	0,25	0,25 EU/ml
INTRAOKULARNA RAZTOPINA	40	1 : 5	4,41	94,98	7,90	< 0,050	0,05	0,25 EU/ml
MAGNEZIJEV SULFAT	36	1 : 200-1 : 400	3,47	98,24	/	< 10,0 – < 20,0	22,5 - 45,0	0,09 EU/mg
NATRIJEV TIOSULFAT	30	1 : 4	2,87	84,85	/	< 0,400	3 - 7,5	0,03 EU/mg
RINGER LAKTAT V 5-odstotnem SORBITOLU	24	1 : 5	5,83	93,88	/	< 0,250	0,25	0,25 EU/ml
ARGININIJEV KLORID	20	1 : 20-1 : 100	5,47	73,54	/	< 0,200 – < 2,00	1 - 3,00	0,01 EU/mg

Vzorec	Število serij	Uporabljene redčitve	Spike Rxn Time CV [%]	Spike Recovery [%]	Sample Rxn Time CV [%]	Rezultati	EL za izdelke [EU/ml]	Predpis za substanco in/ali izdelek (Ph. Eur, USP, interno)
MAGNEZIJEV KLORID	20	1 : 5-1 : 25	4,26	89,89	2,67	< 0,025 – <0,250	0,057 - 0,286	3 EU/g
FENILEFRINIJEV KLORID	18	1 : 100	4,71	89,28	/	< 1,00	2,5	25 EU/mg
KARDIOPLEGIKA koncentrat	15	1 : 5	5,41	98,73	/	< 0,050	0,25	0,25 EU/ml
NATRIJEV HIDROGENKARBONAT	13	1 : 20-1 : 40	3,94	93,20	/	< 0,200 – < 0,400	2,5 - 5	5 EU/mEq
NATRIJEV BENZOAT	11	1 : 200-1 : 400	4,54	78,38	14,10	< 2,00	2,5	0,01 EU/mg
EFEDRINIJEV KLORID	10	1 : 100	3,23	92,00	/	< 1,00	8,5 - 85	1,70 EU/mg
PROKAINIJEV KLORID	9	1 : 40	4,93	85,96	/	< 0,400	1,64 - 6	0,60 EU/mg
NATRIJEV ACETAT	7	1 : 40	5,03	85,57	/	< 0,400	3,9	3,90 EU/mEq
KLONIDINIJEV KLORID	4	1-1 : 5	5,43	85,75	/	< 0,005 – < 0,025	3,3	3,30 EU/ml
METOKSALEN	4	1 : 20	2,20	74,25	/	< 0,200	1	1 EU/ml
ARZENOV TRIOKSID	4	1	3,53	78,75	/	< 0,005	33,3	33,30 EU/mg
NATRIJEV KALCIJEV EDETAT	4	1 : 200	3,48	122,25	6,20	< 1,00	2	2 EU/ml
FENTANILIJEV CITRAT	2	1	1,65	81,00	/	< 0,010	2,5	50 EU/mg
MIDAZOLAMIJEV KLORID	1	1 : 100	5,60	76,00	/	< 0,500	1,786	1,786 EU/ml
RINGER	1	1 : 5	3,80	98,00	/	< 0,250	0,25	0,25 EU/ml
PAPAVERINIJEV KLORID	1	1 : 1000	1,30	107,00	/	< 5,00	116	2,90 EU/mg
<b>skup/povprečno</b>	<b>2895</b>		<b>4,01</b>	<b>90,37</b>	<b>6,71</b>			



Znotraj 75 % vseh proizvedenih in testiranih serij je bilo največ različnih mešanic glukoze in elektrolitov (26,2 %), vode za injekcije (21,2 %), fizioloških raztopin različnih volumnov (13,5 %), raztopin natrijevega citrata (9,3 %) in raztopin različnih koncentracij lidokainijevega klorida (3,9 %). Pri vseh omenjenih vzorcih smo imeli majhno variabilnost paralelnih vzorcev (povprečno 6,7 %) in zelo dobro vrednost pozitivne kontrole – *spike recovery* (84,82–95,55 %) (preglednica 3). Majhna variabilnost vzorcev je posledica tega, da so bile vse vrednosti koncentracije endotoksinov pod endotoksinsko mejo in tudi pod mejo detekcije uporabljene testne ploščice.

V primeru dobljenih manjših vrednosti pozitivnih kontrol (*spike recovery* manj kot 50 %) smo test ponovili pri večji razredčitvi vzorca (ki pa je morala biti manjša od MVD) in/ali z uporabo testne ploščice z večjo občutljivostjo. V večini primerov smo dobili vrednosti znotraj ciljnih vrednosti (75–125 %). Pri uvajanju metode smo bili v začetni fazi omejeni z izbiro testnih ploščic, ker so bile na tržišču komercialno dostopne le ploščice za območji 5–0,05 EU/ml in 10–0,1 EU/ml.

To nas je omejevalo, ko smo želeli uporabiti večjo redčitev. MVD je namreč odvisna od občutljivosti ploščice oziroma koncentracijskega območja endotoksinskega standarda pri umeritvenih premicah. Večje redčitve so namreč najlažji način za nevtralizacijo motečih dejavnikov, ki bi lahko vplivali na potek reakcije. Izdelkom, pri katerih pri testiranju kljub maksimalnim redčitvam nismo dosegli ustreznih vrednosti pozitivnih kontrol, nismo mogli razviti analiznega postopka oziroma določiti vsebnosti bakterijskih endotoksinov. Zato smo jih morali testirati na klasični način v pogodbenem laboratoriju. To je bilo zamudnejše in povezano z dodatnimi stroški, kar za nas kot izdelovalca parenteralnih izdelkov ni bilo sprejemljivo.

Z dostopnostjo občutljivejših ploščic (1–0,01 EU/ml in 0,5–0,005 EU/ml) smo zaradi možnosti 50–100-krat večjega redčenja uspešno razvili še postopke za večino preostalih izdelkov in tako postali skoraj popolnoma avtonomni pri hitri kontroli pirogenov v vseh naših proizvodih.

Začetno kvalifikacijo, ki je nujna za potrditev občutljivosti reagenta LAL oziroma linearnosti odziva ter vrednotenje laboratorija in analitika, smo izvajali enkrat letno. Enako smo naredili tudi pri vsaki novi seriji testnih ploščic ali pa po šestih mesecih uporabe testne ploščice z isto serijsko številko (11-14).

Trenutno sami še ne moremo testirati vzorcev, za katere ni primeren sam princip uporabljene metode. Kromogene kinetične metode zaradi obarvanosti vzorcev ne moremo uporabiti na primer pri raztopini natrijevega fluoresceinata ali metilenskega modrila ter zaradi neprimerne pH vrednosti pri raztopinah z izrazito majhno ali veliko vrednostjo pH.

Do jeseni leta 2010, ko še nismo imeli vzpostavljenih pogojev za samostojno testiranje, smo pogodbenim laboratorijem pošiljali na testiranje vse serije proizvedenih izdelkov. Delež v analizo poslanih serij se je od leta 2011 do 2014 postopno zmanjševal, in sicer na račun razvoja in postopne validacije novih analiznih postopkov ter kasneje tudi zaradi dostopnosti občutljivejših testnih ploščic. V letu 2014 je znašal pogodbeni del analiz le še 3,69 % (33 od skupno 894 vzorcev). Z uvedbo opisane metode smo dosegli, da smo v vseh štirih letih v pogodbenih laboratorijih testirali le še 7,63 % vseh proizvedenih serij, to je 239 serij od skupno 3134 serij (preglednica 4).

*Preglednica 4: Pregled števila vzorcev, analiziranih v Lekarni UKC Lj in pogodbeno, po posameznih letih med 2010–2014.*

*Table 4: Number of analysed samples in house and in contract labs through the years 2010–2014.*

Leto	UKC Lj		Pogodba		Skupaj
<b>2010</b>		0,00 %		100,00 %	
<b>2011</b>	688	85,15 %	120	14,85 %	808
<b>2012</b>	682	93,30 %	49	6,70 %	731
<b>2013</b>	664	94,72 %	37	5,28 %	701
<b>2014</b>	861	96,31 %	33	3,69 %	894
<b>Skupaj</b>	<b>2895</b>	<b>92,37 %</b>	<b>239</b>	<b>7,63 %</b>	<b>3134</b>

## 5 ZAKLJUČEK

Na osnovi literaturnih podatkov in posvetovanja s strokovnjaki na področju testiranja bakterijskih endotoksinov smo se v Lekarni UKC Lj odločili za uvedbo testiranja s sistemom Endosafe® PTS. Testiranje naj bi postalo sestavni del rednih analiz za sproščanje v uporabo vseh serij parenteralnih izdelkov Lekarne UKC Lj. Uvedba testiranja pri-

sotnosti bakterijskih endotoksinov pomeni veliko časovno in finančno racionalizacijo tovrstnega testiranja.

Nove metode, ki omogočajo hitro ugotavljanje in zagotavljanje mikrobiološke kakovosti samih izdelkov in okolja izdelave, predstavljajo izjemen prispevek h kakovosti in učinkovitosti procesa izdelave, kakovosti pripravljenih zdravil in seveda varnosti in učinkovitosti pri uporabnikih – bolnikih.

Prednosti sistema PTS™ so, da za izvedbo testa niso potrebni kontrolirani pogoji niti priprava endotoksinških standardov in umerjanja, da je izvedba relativno enostavna in rezultati dosegljivi v 15-ih minutah. Vse to predstavlja učinkovito orodje kontrole tveganja in močno skrajša fazo kontrole pogojev izdelave in končnega produkta ter tako zagotavlja veliko učinkovitost in izboljšan sistem vodenja kakovosti tako izdelkov kot proizvodnih procesov.

## 6 LITERATURA

1. Tršan M: *Dobra proizvodna praksa sterilnih izdelkov v bolnišnični lekarni s poudarkom na testiranju bakterijskih endotoksinov. Lekarniška zbornica Slovenije, Specialistična naloga*; 2010.
2. Prince R: *Microbiology in Pharmaceutical Manufacturing, Second Edition, Revised and Expanded, Volume I and II, PDA*, 2008.
3. Akers MJ, Larrimore DS. *Parenteral Quality Control: Sterility, Pyrogen, Particulate and Package Integrity Testing, 3th Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker Inc.*; 2003.
4. Williams KL. *Endotoxins, 3th Edition, Informa Healthcare USA*, 2007.
5. Podričnik S. *Cianotiofenski zaviralci lize murf kot potencialne protibakterijske učinkovine. Fakulteta za Farmacijo, Diplomaska naloga*; 2014.
6. Škof A, Kržič M, Grosman P, Hes S. *Bakterijski endotoksini in pirogeni z vidika kakovosti in varnosti zdravil za parenteralno uporabo. Formularium Slovenicum s 6. dopolnilom (strokovno posvetovanje). Zavod za farmacijo in preizkušanje zdravil*; 2004: 21–32.
7. 2.6.8. *Pyrogens, In: European Pharmacopeia, 8th edition, Council of Europe*; 2015.
8. 2.6.14. *Bacterial Endotoxins. In: European Pharmacopeia, 8th edition. Council of Europe*; 2015.
9. 5.1.10 *Guidelines for using the test for bacterial endotoxins. In: European Pharmacopeia, 8th edition. Council of Europe*; 2015.
10. 2.6.30 *Monocyte Activation Test. In: European Pharmacopeia, 8th edition. Council of Europe*; 2015.
11. Easter MC. *Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry. CRC Press*; 2003.
12. *The Endosafe - PTS™ ® Portable Test System User's Guide Version 7* <http://www.criver.com/>. Dostop: 01-05-2015.
13. *Guideline on validation of the LAL test as an End-product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products and Medical Devices, U. S. Department of Health and Human Services, http://gmp.pharmout.net/view\_pdf.php?file=ucm070286-1987-12-00.pdf. Dostop 01.05.2015.*
14. Charles River. *Endosafe®-PTS and Regulatory Requirements, Technical Sheet. http://www.criver.com/files/pdfs/emd/endotoxin/endosafe-pts-and-regulatory-requirements.aspx. Dostop:01-05-2015.*

