proLékaře.cz | 11.7.2025

https://doi.org/10.36290/csf.2024.026

Nové přístupy k problematice pyrogenů v parenterálních přípravcích

Michal Janů
Nemocniční lékárna, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Článek poskytuje základní náhled na patofyziologii působení exogenních a endogenních pyrogenů, v souvislosti s parenterálním podáváním léčiv a použitím zdravotnických prostředků. Vysvětluje, že pyrogeny způsobují zvýšení tělesné teploty aktivací termoregulačního centra v hypothalamu, přičemž nejčastějším zdrojem pyrogenní zátěže jsou bakteriální lipopolysacharidy. Kontaminace pyrogenními látkami v léčivých přípravcích může způsobit nežádoucí účinky, včetně život ohrožujících stavů. Text se zaměřuje na moderní metody identifikace pyrogenů, respektive endotoxinů a výběr vhodných analytických postupů jejich stanovení. Ty zahrnují in vivo testy na králících a test bakteriálních endotoxinů a in vitro testy, jako je test aktivace monocytů a test za pomoci rekombinantního faktoru C. Součástí práce je detailní popis provádění těchto testů, jejich výhody a nevýhody a vývoj metod detekce pyrogenů v léčivých přípravcích. Autor vysvětluje základní důvody falešně pozitivních a negativních výsledků testování, a ilustruje výpočty limitů pro endotoxiny. Podává informace o nové strategii Evropského a Českého lékopisu k této problematice, zdůrazňuje snahy o snižování pyrogenní zátěže a potřebu kontroly mikrobiologické a endotoxinové úrovně kontaminace.

Klíčová slova: pyrogeny, endotoxiny, testování, limity.

New approaches to the issue of pyrogens in parenteral preparations

The article provides a basic understanding of the pathophysiology of exogenous and endogenous pyrogens, particularly in the context of parenteral administration of drugs and the use of medical devices. It explains that pyrogens cause an increase in body temperature by activating the thermoregulatory center in the hypothalamus, with bacterial lipopolysaccharides being the most common source of pyrogenic burden. Contamination of pharmaceuticals with pyrogenic substances can lead to adverse effects, including life-threatening conditions. The text focuses on modern methods for identifying pyrogens, specifically endotoxins, and selecting suitable analytical procedures for their determination. These include in vivo tests on rabbits and the bacterial endotoxin tests, as well as in vitro tests such as the monocyte activation test and the recombinant Factor C test. The work includes a detailed description how to perform these tests, their advantages and disadvantages, and the development of methods for detecting pyrogens in pharmaceuticals. The author explains the reasons of false positive and negative test results, and ilusrates the calculations of threshold endotoxin limits. Information is provided on the new strategy of the European and Czech Pharmacopoeias on this issue, emphasizing efforts to reduce pyrogenic burden and the need to control both microbiological and endotoxin contamination levels.

Key words: pyrogens, endotoxins, testing, limits.

Pyrogeny představují skupinu látek schopných vyvolat zvýšení tělesné teploty prostřednictvím aktivace termoregulačního centra v hypothalamu. V lidském organismu je horečka charakteristickým projevem bakteriální infekce, přičemž zvýšení tělesné teploty v těchto případech úzce souvisí s pyrogenním účinkem lipopolysacharidů, které tvoří nedílnou součást buněčných stěn gramnegativních bakterií (1). Bakteriální lipopolysacharidy (LPS) jsou považovány za silné aktivátory vrozeného imunitního systému. Hrají klíčovou roli v patogenezi bakteriálních infekcí a sepse. Obecně lze tedy konstatovat, že mikroorganismy a jejich toxiny působí jako exogenní pyrogeny a stimulují uvolňování

PharmDr. Michal Janů, Ph.D., MHA
Nemocniční lékárna, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
michal.janu@vfn.cz

Cit. zkr: Čes. slov. Farm. 2024;73(3):169-174
Článek přijat redakcí: 15. 4. 2024
Článek přijat po recenzích: 20. 8. 2024

proLékaře.cz | 11.7.2025

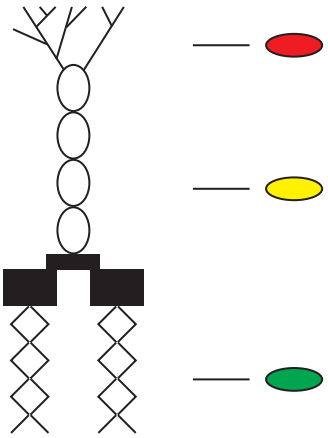
endogenních pyrogenů. Mezi endogenní pyrogeny řadíme: interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF) a interferony uvolňované monocyty a makrofágy. V některých případech jsou za pyrogenní reakci zodpovědné i další entity.

Léčivé přípravky podávané parenterálně mohou způsobit nežádoucí účinky v důsledku možné kontaminace pyrogenními látkami (2). Tato kontaminace se může projevovat horečkou, třesavkou, pocením, pyrexií, myalgií, tachykardií, hypotenzí a vazodilatací, případně až život ohrožujícími příznaky podobnými šoku. Vyšetření pyrogenity v léčivých přípravcích slouží k minimalizaci rizika horečnaté reakce u pacienta, která může vzniknout v důsledku podání daného přípravku, a to na úroveň, která je považována za přijatelnou. To se týká především přípravků aplikovaných ve velkém objemu, jako jsou infuze. Pyrogenní kontaminanty vyvolávají pyrogenní reakce, ke kterým dochází během první hodiny aplikace infuze. Stanovení hraniční akceptovatelné hodnoty pro obsah pyrogenů závisí přímo na celkovém aplikovaném objemu (dávce) přípravku a aplikační cestě (3).

Pyrogenní látky jsou nejčastěji mikrobiálního původu, takzvané bakteriální endotoxiny, pocházející z gramnegativních mikroorganismů. Nejčastěji jejich chemickou povahu vystihuje označení lipopolysacharid, viz výše. Ten se skládá ze tří složek, z nichž za horečku a ostatní biologické účinky je odpovědný Lipid A (Obr. 1). Během terminální sterilizace, kdy bakterie hynou, dochází k jejich autolýze. Tento děj vede k uvolnění většiny endotoxinů z buněk do roztoku. Gramnegativní bakterie se mohou vyskytovat ve špatně technologicky připravených produktech, zejména těch získaných biologickými metodami. Jejich přítomnost je také často důsledkem chyby ve výrobním procesu (4).

Do parenterálních přípravků, ale rovněž do zdravotnických prostředků, se mohou pyrogeny dostat z několika zdrojů. Obvykle to jsou: voda použitá jako rozpouštědlo nebo jako pomocná látka v průběhu výroby; obalové komponenty; chemické látky a suroviny nebo zařízení použité při přípravě produktu. Pokud je léčivá látka produkována biologicky, neúplné odstranění mikroorganismu během čištění může mít za následek, že léčivá látka má vysoké hladiny endotoxinů. Příkladem mohou být antibiotika vyráběná fermentací, nebo případně vedlejší produkty gramnegativních bakterií používané k výrobě geneticky upravených léčivých přípravků. Standardní výrobní postup má zahrnovat i kontrolu mikrobiologické a endotoxinové úrovně kontaminace ve výše uvedených potenciálních zdrojích.

Obr. 1. *Schéma struktury endotoxinu*



Červeně o-antigen, žlutě jádro LPS, zeleně lipid A (File:LPS3.svg - Wikimedia Commons)

„Mikrobiální pyrogen" na rozdíl od „gramnegativního bakteriálního endotoxinu" se stal obecným popisným termínem pro mnoho různých látek. Pyrogenní látky jsou nejčastěji produkovány gramnegativními bakteriemi, avšak mohou být také produkovány některými grampozitivními bakteriemi, mykobakteriemi, plísněmi a také viry (5). Ve farmaceutické technologii je za hlavní pyrogenní látky možné považovat:

- bakteriální endotoxiny (např. lipopolysacharidy (LPS), peptidoglykany (PGN) nebo lipoteichoové kyseliny)
- pseudopyrogeny (vyvolávají zvýšení tělesné teploty jinými mechanismy než pravé pyrogeny – např. cizorodé částice v infuzních roztocích mohou být mylně identifikovány organismem jako pyrogeny, což vede k reakci, která napodobuje účinek skutečných pyrogenů, aniž by byla aktivována obvyklá imunitní odpověď spojená s infekcí nebo zánětem)
- virové pyrogeny
- některé nízkomolekulární léky
- nízkomolekulární proteiny
- nebakteriální polypeptidy, polysacharidy (2)

Řada pyrogenů jsou látky s velkou molekulou, které bývají v roztocích jako agregáty, lze je tedy zachytit ultrafiltrací na přepážkách z alifatických polymerů (4).

Pokud není možné se stanovenou hladinou jistoty potvrdit skutečnost, že možné pyrogenní kontaminanty jsou pouze bakteriální endotoxiny, je třeba provést analýzu rizik (ne)přítomnosti non-endotoxin pyrogenů. V případě neprůkaznosti nepřítomnosti non-endotoxin pyrogenů je třeba použít některou z metod detekce širokého spektra pyrogenů (Tab. 1).

Metody pro stanovení pyrogenních látek

1. Detekce širokého spektra pyrogenů

a. Pyrogenní test na králících (Rabitt pyrogen test – RPT) (lékopisný článek 2. 6. 8)

Tab. 1. *Metody pro stanovení pyrogenních látek*

	Detekce širokého spektra pyrogenů	Detekce zaměřená na endotoxiny
Animal based method Metoda založená na využití zvířat	Rabitt pyrogen test (RPT) Pyrogenní test na králících	Bacterial endotoxin test (BET) Zkouška na bakteriální endotoxiny
In vitro method Metoda prováděná mimo živý organismus	Monocyty activation test (MAT) Test aktivace monocytů	Recombinant factor C (rFC) Zkouška na bakteriální endotoxiny za použití rekombinantního faktoru C

proLékaře.cz | 11.7.2025

Pyrogenní látky obsažené ve sterilním injekčním roztoku vyvolávají u králíka po nitrožilním podání vzestup jeho rektální teploty.

Výběr zvířat: Ke zkoušce se použijí zdraví dospělí králíci o hmotnosti nejméně 1,5 kg. Zvířata jsou chována v klidném prostředí v individuálních klecích, krmena standardní vyváženou dietou bez obsahu antibiotik a jejich hmotnost nevykazuje během týdne před zkouškou žádný úbytek. Teplota chovné místnosti je stálá a neliší se o více než 3 °C od teploty zkušební místnosti. Po zkoušce s nepyrogenním výsledkem se může králík vzít do nové zkoušky nejdříve za 3 dny, po zkoušce s pyrogenním přípravkem se tento interval prodlužuje na 3 týdny.

Přístrojové vybavení: Pohyblivost králíka při zkoušce se omezuje vhodným zařízením, které fixuje netraumatizujícím způsobem pouze šíji zvířete a dovolí mu zaujmout normální uvolněnou pozici v sedě. K měření tělesné teploty se použijí rektální teploměry nebo elektrické termometry, které udávají teplotu s přesností 0,1 °C. Všechny prostředky použité v kontaktu s králíkem musí být apyrogenní. Nejprve se provádí předběžné testování králíků. Následuje vlastní provedení zkoušky.

Zkouška se provádí v oddělené nerušené místnosti se stálou teplotou kolem 20 °C. Ke zkoušce se použijí tři králíci, kterým je večer předtím odebrána potrava. Po upoutání do fixačního zařízení a zavedení rektálních termometrů se u každého zvířete 90 min sleduje tělesná teplota v 30min intervalech. Zkoušený roztok, zahřátý na teplotu asi 38,5 °C, se pomalu vstříkne do marginální ušní žíly králíka s dobou podání nejvýše 4 min, není-li v příslušném článku uvedeno jinak. Množství látky se pro provedení zkoušky liší podle zkoušeného přípravku a je předepsáno v příslušném článku. Objem vstřikovaného roztoku má být nejméně 0,5 ml/kg a nejvýše 10 ml/kg tělesné hmotnosti. Reakce králíka je vyjádřena rozdílem mezi jeho výchozí a maximální naměřenou teplotou. Jestliže je tento rozdíl negativní, je výsledek počítán jako nulová odpověď. Výsledek zkoušky se posoudí na základě naměřených vzestupů rektální teploty u použité skupiny králíků (6).

Výhody: tradiční metoda (poprvé uvedená v ČSL 2 v roce 1954) (7) založená na podobné reakci zvířecího organismu na přítomnost pyrogenu/ů v organismu jako u člověka.

Tato metoda měla svůj zásadní význam zejména u následujících typů přípravků:

- Intravenózní roztoky: Roztoky určené pro intravenózní podání, jako jsou elektrolytové roztoky, roztoky pro parenterální výživu, a injekční roztoky.
- Dialyzační roztoky: Roztoky používané při hemodialýze, kde je kritická absence pyrogenů vzhledem k přímému kontaktu s krevním oběhem.
- Implantáty a lékařské přístroje: Implantabilní materiály, jako jsou katétry nebo stenty, které přicházejí do kontaktu s tkáněmi nebo krevním řečištěm.
- Biologické přípravky: Například vakcíny a další biologické produkty, kde je testování na pyrogeny nezbytné pro zajištění bezpečnosti pacienta.
- Roztoky pro oplachování dutin těla: Např. roztoky pro oplachování peritoneální dutiny během chirurgických zákroků.

Nevýhody: biologický a kvalitativní test využívající laboratorní zvíře (3R – Replacement, Reduction, Refinement), časově i ekonomicky náročné, nutnost zaškolení personálu, nutnost trénování používání laboratorních zvířat. Test nelze použít v případě toxicity aktivní látky, případně pokud aktivní látka sama teplotu ovlivňuje.

Úplné odstranění RPT z evropského lékopisu (Ph. Eur.) se dle doporučení jednotlivých lékopisných komisí jeví jako nezbytné z důvodu vyloučení použití laboratorních zvířat. Pro kontrolu pyrogenity (endotoxiny a nonendotoxiny) je cílem přejít k výhradnímu použití testů in vitro (tj. BET nebo MAT) (8).

b. Test aktivace monocytů (Monocyty activation test – MAT) (lékopisný článek 2. 6. 30)

Obecná monografie 2. 6. 30. Test aktivace monocytů (MAT) byla zavedena do Ph. Eur. v roce 2009 a poskytuje in vitro alternativu k RPT. Test aktivace monocytů napodobuje lidskou imunitní reakci inkubací monocytů s testovaným vzorkem. Tento test je schopný detekovat jak endotoxinové, tak neendotoxinové pyrogeny. V přítomnosti pyrogenů dochází k aktivaci monocytů, které následně produkují zánětlivé molekuly, cytokiny, jež jsou odpovědné za horečnatou reakci. Tyto cytokiny jsou poté detekovány pomocí imunologického testu (ELISA), který využívá specifické protilátky a enzymatickou barevnou reakci.

PyroCell Monocyte Activation Test Systems je příkladem detekční soupravy pro stanovení pyrogenů metodou MAT. Tyto soupravy jsou optimalizované a validované pro citlivou detekci pyrogenů ve farmaceutických přípravcích. Systém PyroCell MAT, IL-6® zahrnuje mononukleární buňky získané z kryokonzervované periferní krve (PBMC), které jsou sdružené od čtyř lidských dárců (pMAT buňky), spolu s optimalizovaným kultivačním médiem.

Test se provádí v několika krocích. Prvním krokem je rozmrazení kryokonzervovaných pMAT buněk, které se poté inkubují se zkoušenou látkou jako buněčné kultury po dobu 18–24 hodin. Následující den se sbírají supernatanty buněčných kultur, a cytokin IL-6, uvolňovaný aktivovanými lidskými monocyty, se detekuje pomocí lidského ELISA testu IL-6. Měření absorbance se provádí na čtečce absorbance. Naměřené hodnoty jsou následně přepočítány na ekvivalentní jednotky endotoxinu (EEU/ml) pomocí referenčních ředění endotoxinů. Test je ověřen s použitím soupravy Pelikine compact human IL-6 ELISA, která zajišťuje robustní a spolehlivé výsledky (9).

Výhody MAT:

- Široké spektrum detekce pyrogenů: MAT dokáže detekovat nejen endotoxiny (pyrogeny pocházející z gramnegativních bakterií), ale také neendotoxinové pyrogeny, jako jsou pyrogeny z gram-pozitivních bakterií, hub nebo virů.
- Humánní přístup: MAT je in vitro test, což znamená, že nevyžaduje použití živých zvířat. To snižuje etické a právní problémy spojené s testováním na zvířatech a je v souladu s principy 3R.
- Lepší reprodukovatelnost: Test poskytuje vyšší konzistenci a spolehlivost výsledků než některé in vivo testy, díky standardizovaným podmínkám a použití specifických lidských monocytů.
- Lepší predikce lidské odpovědi: Protože MAT používá lidské buňky, může lépe napodobovat imunitní odpověď člověka na pyrogeny

proLékaře.cz | 11.7.2025

než testy na zvířatech, což vede k relevantnějším výsledkům pro humánní použití.

Nevýhody MAT:

- Složitost a náklady: MAT je technicky náročnější a vyžaduje více kroků v laboratorním prostředí než některé jednodušší testy, jako je BET. To může zvýšit náklady na testování a vyžadovat speciálně vyškolený personál.
- Citlivost na laboratorní podmínky: Výsledky MAT mohou být ovlivněny variabilitou v přípravě a kvalitě buněk, jakož i podmínkami inkubace a manipulace. To může vést k vyššímu riziku falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků, pokud nejsou podmínky přísně kontrolovány.
- Omezená dostupnost komerčních souprav: Na trhu je méně komerčně dostupných souprav pro MAT ve srovnání s jinými testovacími metodami, což může omezit jeho dostupnost pro některé laboratoře.
- Regulační uznání: Ačkoli MAT je uznán v některých lékopisech (např. Ph. Eur.), stále může být méně rozšířený nebo preferovaný ve srovnání s tradičními metodami v některých jurisdikcích nebo pro specifické aplikace (9).

2. Detekce zaměřená na endotoxiny

a. Bakteriální endotoxinový test (Bacterial endotoxin test – BET) (lékopisný článek 2. 6. 14)

Jako první byl pro detekci endotoxinů vyvinut test gelové sraženiny Lyzátu amebocytů kraba rodu Limulus (LAL), následně se objevily další, pokročilejší varianty testu LAL. Lyzát amebocytů je vodný extrakt z pohyblivých krvinek (amebocytů) z ostrorepa atlantského Limulus polyphemus, případně Tachypleus tridentatus. LAL reaguje s bakteriálními endotoxiny, jako jsou lipopolysacharidy (LPS). Tato reakce je základem testu LAL, který je široce používán pro detekci a kvantifikaci bakteriálních endotoxinů. Tyto testy mohou nejen určit přítomnost/nepřítomnost endotoxinu ve vzorku, ale také odhalit, kolik endotoxinu je přítomno. To je zajištěno porovnáním zjištěné hodnoty s referenční hodnotou standardu. Tato kvantitativní data usnadňují shodu s testováním kontroly kvality (QC) a poskytují standardy integrity dat pro širokou škálu aplikací.

α. Kvalitativní stanovení endotoxinu – Test gelové sraženiny LAL

Je tou nejjednodušší formou testu LAL a nejvíce se podobá původně vyvinuté metodě BET. Jedná se o nečastější test uváděný v lékopisných monografiích. Poskytuje snadno čitelný kvalitativní i kvantitativní výsledek indikující přítomnost nebo nepřítomnost endotoxinu ve zkušebním vzorku. Test gelové sraženiny LAL zahrnuje smíchání činidla LAL s testovaným vzorkem ve zkumavce, která se poté inkubuje. Pokud je ve vzorku přítomen endotoxin, spustí se srážecí reakce. Po uplynutí inkubační doby se zkumavka prohlédne, aby se zjistilo, zda se na dně zkumavky vytvořila sraženina (nebo gel). Pozitivní výsledek je tedy potvrzen přítomností sraženiny, která zůstává na dně zkumavky při jemném převrácení, zatímco negativní výsledek je charakterizován přítomností tekutiny stékající po vnitřní straně zkumavky. Jedná se tedy o limitní zkoušku, jejíž výhodou je jednoduchost a nižší cena. Nevýhodou je neznámé množství endotoxinu, a to jak v případě pozitivního, tak i v negativního výsledku (s výjimkou skutečnosti, že se výsledné množství endotoxinu nachází nad nebo pod stanoveným limitem).

β. Kvantitativní stanovení endotoxinu

Umožňuje přesné stanovení množství endotoxinu v přípravku a následné další nastavení risk managementu v rámci výroby, zejména s ohledem na možnost nastavení limitů, kontrolních opatření (je možné okamžitě identifikovat a řešit zdroje kontaminace) a efektivního řízení rizik.

Chromogenní test

Jedná se o metodu optické spektroskopické analýzy, která umožňuje měření přítomnosti analytu (kvalitativní analýza) a jeho koncentrace v různých prostředích (kvantitativní analýza) prostřednictvím změn barev.

Turbidimetrická metoda

Metoda je založena na spektrofotometrickém měření. Jde tedy o jev, kdy se pevné částice objeví v homogenním roztoku. Přenášené světlo je měřeno v určité vlnové délce, následně se získá hodnota, která je úměrná koncentraci látky (10, 11).

Aby byla detekce endotoxinů při využití LAL testu platná, musí být prokázáno, že zkušební ředění nepřekračuje maximální možné ředění a že zkoušené ředění neprokazuje inhibici nebo zesílení expozice při použití známé koncentrace endotoxinu. Maximální platné ředění (MVD) je maximální přípustné ředění vzorku, při kterém lze stanovit limit endotoxinu. LAL test může být poměrně náchylný k interferenci. Obvykle je však test LAL citlivější, než je potřebné k detekci limitu endotoxinů pro daný produkt. Validace postupu vyžaduje, aby byly tři šarže testovány na interferující faktory. Test interferujících faktorů pomocí gelové sraženiny vyžaduje, aby byl produkt validován podle požadavku výrobce pro použitou citlivost testu. Za tímto účelem se vyrábí standardní řada v LAL reagenční vodě (LRW), která obsahuje 2λ, λ, 1/2 λ a 1/4 λ, kde λ představuje citlivost lyzátu. Paralelně se provádí druhá standardní řada stejných koncentrací s použitím přípravku (při neinterferenčním ředění nebo účinném ošetření produktu). Tato standardní řada musí také obsahovat 2λ, λ, 1/2 λ a 1/4 λ v minimálně čtyřnásobném provedení.

Kaskáda LAL se skládá z řady enzymatických reakcí. Rychlost reakce ovlivňuje řada faktorů, jako je pH a teplota. Je tedy důležité, aby pH reakční směsi produktu a činidla LAL bylo v požadovaném rozmezí. Dvojmocné kationty, jako je vápník (Ca^{2+}) a hořčík (Mg^{2+}), neutralizují záporný náboj endotoxinu, to následně zvyšuje agregaci a tím snižuje aktivitu/účinnost endotoxinu, což vede k inhibici reakce. To má za následek falešně negativní výsledky. Obvyklým řešením tohoto problému je vhodné naředění, případně lze endotoxin od interferujících látek oddělit ultrafiltrací pomocí asymetrického membránového filtru z celuloso-triacetátu (12). Látky, které vážou (chelátotvorné) dvojmocné kationty, jako je EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a heparin, mohou snížit stav agregace endotoxinu. To má za následek zvýšenou reaktivitu v průběhu testu

proLékaře.cz | 11.7.2025

Tab. 2. *Výpočty limitu endotoxinů pro jednotlivé léčivé přípravky (15)*

Hodnoty pro K a M		
Způsob podání	**K**	**M**
Intravenózní, u parenterálních přípravků injekce jiné než intravenózní (intramuskulární, subdermální)	5 EU/kg tělesné hmotnosti	Maximální dávka léčivého přípravku/kg podaná za jednu hodinu
Intravenózní dávka pro radiofarmaka	175 EU	Objem maximální doporučené dávky v době použití
Intratekální parenterální podání	0.2 EU/kg tělesné hmotnosti	Maximální dávka léčivého přípravku/kg podaná za jednu hodinu
Intratekální podání u radiofarmak	14 EU	Objem maximální doporučené dávky v době použití

Poznámka: U některých přípravků, například u vody na injekce, mnoha velkoobjemových parenterálních přípravků a nitroočních tekutin, kde není stanovena konkrétní dávka, jsou limity endotoxinů přiřazeny, nikoli vypočteny. Obvyklá dospělá osoba má hmotnost 70 kg.

a falešně pozitivní výsledky. I zde je ředění nejlepší volbou odstínění problému. Proteinové produkty nebo proteiny v krvi a krevních frakcích mohou vázat endotoxin a znemožnit jeho detekci v testu LAL. Alternativně některé proteázy degradují proteiny enzymové kaskády, zatímco jiné (např. trypsin) ji aktivují. Běžně se k denaturaci proteinu používá tepelné zpracování vzorku, čímž se umožní detekce endotoxinu odolného vůči teplu (13).

b. Test rekombinantním faktorem C (Recombinant factor C test – rFC) (lékopisný článek 2. 6. 32)

Jedná se o nejnovejší lékopisnou monografii pro hodnocení prítomnosti endotoxinu. Rekombinantní faktor C je geneticky upravený protein, který se normálně nachází v kaskádě lyzátu amebocytů Limulus. Faktor C reaguje s endotoxinem a spojuje se s markerem za vzniku kvantifikovatelného konečného produktu. Rekombinantní test faktoru C používá stejný princip jako test LAL, ale bez potřeby materiálu pocházejícího ze zvířat. V tomto testu lze použít dvě detekční techniky: techniku koncové fluorescence, založenou na detekci koncového bodu, která je založena na vývoji fluorescence po aktivaci syntetického komplexu peptid-fluorofor; nebo chromogenní technika, založená na vývoji barvy po rozštěpení syntetického komplexu peptid-chromofor. K přesné detekci endotoxinů se test provádí za použití materiálů bez endotoxinů s laboratorními kontrolami, které zabraňují neúmyslnému náhodnému uvolnění endotoxinů (14).

Výpočty limitu endotoxinů pro jednotlivé léčivé přípravky

Účinky endotoxinu souvisejí s množstvím endotoxinu v dávce přípravku podané pacientovi. Vzhledem k tomu, že se dávka liší u jednotlivých produktů, je limit endotoxinů vyjádřen jako K/M (Tab. 2, vzorec (1)).

K je 5,0 EU/kg (kg), což představuje přibližnou prahovou dávku endotoxinu pro člověka a králíka po intravenózní aplikaci. Pokud je přípravek označen pro intratekální injekci, pak K je 0,2 EU/kg.

M představuje zkušební dávku endotoxinu pro králíka nebo maximální dávku pro člověka na kilogram, která by byla podána za jednu hodinu, podle toho, která hodnota je větší.

Vzorec 1

$$EL = \frac{K}{M}$$

(USP <85>, EP 2.6.14)

EL – limit endotoxinu; K – přibližná prahová dávka endotoxinu pro člověka a králíka; M – zkušební dávka endotoxinu u králíka nebo maximální dávka pro člověka na kilogram, která by byla podána za jednu hodinu, podle toho, která hodnota je větší

Příklady k řešení:

Příklady ukazují možnosti výpočtu limitu endotoxinů pro jednotlivé léčivé přípravky jako maximální dávku léčivého přípravku/kg podanou za jednu hodinu v případě intravenózního, respektive intratekálního parenterálního podání (výpočet 1., respektive 3.) a tytéž výpočty pro dospělou osobu, vážící 70 kg (výpočet 2., respektive 4.).

1. *Produkt A, Maximální dávka M = 50 mg/kg, Dospělá osoba, Typ podání – intramuskulární, Délka podání – jednorázová, Koncentrace 25 mg/ml*

$$EL = \frac{5\,\frac{EU}{kg}}{50\,\frac{mg}{kg}} = 0{,}1\ EU/mg$$

$$EL = 0{,}1\ EU/mg \times 25\ mg/ml = 2{,}5\ EU/ml$$

2. *Produkt A, Maximální dávka M = 50 mg/dospělá osoba, Typ podání – intramuskulární, Délka podání – jednorázová, Koncentrace 25 mg/ml*

$$EL = \frac{300\,\frac{EU}{osoba}}{50\,\frac{mg}{osoba}} = 7\ EU/mg$$

$$EL = 7\ EU/mg \times 25\ mg/ml = 175\ EU/ml$$

3. *Produkt B, Maximální dávka M = 50 mg/kg, Dospělá osoba, Typ podání – intratekální, Délka podání – jednorázová, Koncentrace 25 mg/ml*

$$EL = \frac{0{,}2\,\frac{EU}{kg}}{50\,\frac{mg}{kg}} = 0{,}004\ EU/mg$$

$$EL = 0{,}004\ EU/mg \times 25\ mg/ml = 0{,}1\ EU/ml$$

proLékaře.cz | 11.7.2025

4. *Produkt B, Maximální dávka M = 50 mg/dospělá osoba, Typ podání – intratekální, Délka podání – jednorázová, Koncentrace 25 mg/ml*

$$EL = \frac{14 \frac{EU}{osoba}}{50 \frac{mg}{osoba}} = 0{,}28\ EU/mg$$

$$EL = 0{,}28\ EU/mg \times 25\ mg/ml = 7\ EU/ml \quad (15)$$

Nová strategie hodnocení pyrogenity v Evropském lékopise (PhEur)

V Evropském lékopise se připravuje zavedení nové obecné kapitoly 5. 1. 13 Pyrogenicita. Tato kapitola bude sloužit jako návod pro uživatele při výběru a provádění vhodného testu ke kontrole pyrogenity farmaceutických produktů, a to buď prostřednictvím testu na bakteriální endotoxiny (BET), nebo testu aktivace monocytů (MAT). Součástí kapitoly bude také odůvodnění volby konkrétního testu.

Pokyny budou zahrnovat úvahy týkající se posouzení rizik, které jsou nezbytné pro podporu použití BET jako jediného testu pyrogenity. Tyto úvahy budou vycházet z detailních znalostí produktu, například surovin, výrobního procesu a dalších relevantních faktorů, které by mohly vést k přítomnosti pyrogenů, jež BET nemusí detekovat.

Monografie Pyrogenicita bude odkazovat na současné obecné kapitoly, které popisují metody pro kontrolu pyrogenity, jako jsou kapitoly 2. 6. 14 Bakteriální endotoxiny, 2. 6. 30 Test aktivace monocytů a 2. 6. 32 Test na bakteriální endotoxiny využívající rekombinantní faktor C. Dále budou zahrnuty odkazy na stávající texty Ph. Eur., které lze využít k nastavení vhodných limitů, například kapitola 5. 1. 10 pro bakteriální endotoxiny (16, 17).

Kontrola depyrogenizačního procesu

Depyrogenizace je proces, kde je působením vysoké teploty (optimálně 250–300 °C) po stanovenou dobu redukován počet bakteriálních endotoxinů (pyrogenů). Lékopisné postupy depyrogenizace (snížení obsahu lipopolysacharidů) suchým teplem jsou definovány jako vystavení materiálu po dobu 30 min při teplotě 250 °C, mohou být použity i jiné validované kombinace teploty a času, pokud zajistí eliminaci pyrogenů. Minimální požadovaná kombinace je čas 3 hodiny a teplota 180 °C. Validační kritérium je snížení minimálně o 3 log zachyceného endotoxinu v mezinárodních jednotkách (IU), přičemž se musí zkoušet počáteční hladina a zbytková hladina endotoxinu. K výpočtu akumulované destrukce endotoxinu FH lze použít následující vzorec (vzorec (2)) (17, 18):

Vzorec 2

$$F_H = \int_{t_1}^{t_2} 10^{\left(\frac{T-250}{50}\right)} = \sum_{t_1}^{t_2} 10^{\left(\frac{T-250}{50}\right)} \Delta t$$

t1 – doba, kdy naměřená teplota poprvé vystoupí nad 250 °C; t2 – doba, kdy naměřená teplota je naposledy nad 250 °C; T – teplota naměřená v každém časovém inkrementu; Δt – časový interval, ve kterém se provádí teplotní měření; k výpočtu lze použít pouze T> 250 °C

Závěr

V rámci připravovaného zavedení nové obecné kapitoly 5. 1. 13 Pyrogenicita v Evropském lékopise dojde také k revizi článku týkajícího se parenterálních přípravků. Tato revize zahrnuje změny v označování těchto přípravků v kontextu jejich pyrogenity a přítomnosti endotoxinů. Důležité změny budou zahrnovat aktualizaci terminologie a metodologie pro hodnocení přítomnosti endotoxinů v parenterálních produktech:

- Označení jako „prosté bakteriálních endotoxinů“ (free from bacterial endotoxins):

V případě, že parenterální přípravky jsou označeny jako „prosté bakteriálních endotoxinů“, bude jejich kvalita hodnocena prostřednictvím testů popsaných v kapitole 2. 6. 14 Bakteriální endotoxiny nebo kapitole 2. 6. 32 Test na bakteriální endotoxiny využívající rekombinantní faktor C. Tyto testy poskytují specifické údaje o přítomnosti endotoxinů v přípravku, které jsou zásadní pro zajištění jejich bezpečnosti.

- Označení jako „nepyrogenní“ (apyrogenic):

Pokud je parenterální přípravek označen jako „nepyrogenní“, bude jeho pyrogenita hodnocena testem podle kapitoly 2. 6. 30 Test aktivace monocytů. Tento test je navržen k detekci širokého spektra pyrogenů, včetně těch, které nejsou detekovatelné standardními testy na endotoxiny, a poskytuje tak komplexní pohled na pyrogenní zatížení produktu.

Tato změna v označování a hodnocení je klíčová pro zajištění přísné kontroly kvality a bezpečnosti parenterálních přípravků. Revize článku Parenterália zabezpečí, že správné testovací metody jsou aplikovány na základě specifických požadavků na přítomnost endotoxinů a pyrogenů, což umožní přesnější hodnocení a zvýšení bezpečnosti léčiv. Tím se zajistí, že farmaceutické produkty budou odpovídat nejnovějším standardům kvality a budou bezpečné pro použití v klinické praxi.

LITERATURA

1. Zámečník J. Patologie. Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1
2. Combes RD. Comprehensive Medicinal Chemistry II, 1.12 – Alternatives to Animal Testing, 2007;1:463-487.
3. Silva CC, et al. Applicability of the Monocyte Activation Test (MAT) for hyperimmune sera in the routine of the quality control laboratory: Comparison with the Rabbit Pyrogen Test (RPT). Toxicology in Vitro 32 (2016):70-75.
4. Komárek P, Rabišková M, et al. Technologie léků. Praha: Galén; 2006:252-253.
5. Bacterial Endotoxins/Pyrogens [online]. FDA, [cit. 11/04/2024]. Available from https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/bacterial-endotoxinspyrogens.
6. Český lékopis 2017. Článek 2. 6. Biologické zkoušky 2. 6. 8. Pyrogenní látky. Praha: Grada; 2017: 254.
7. Československý lékopis, vydání druhé. ČsL 2. Praha Státní zdravotnické nakladatelství: Praha; 1954: 137-138.
8. Vítková E. Metody detekce pyrogenních látek. Vnitřní sdělení SUKL. Praha; 28. 1. 2020.
9. Pyrogen testing with the Monocyte Activation Test | Lonza [online]. [cit. 11/04/2024]. Available from https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/sustainable-pyrogen-testing-with-the-pyrocell-monocyte-activation-test.
10. The History of Limulus and Endotoxin [Internet]. Marine Biological Laboratory. Archived from the original on 28 October 2008. [cit. 11/04/2024]. Available from http://www.mbl.edu/marine_org/images/animals/Limulus/blood/bang.html.
11. Guidance for Industry: Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers [online]. U.S. Food and Drug Administration. Retrieved 5 March 2019 [cit. 11/04/2024]. Available from Guidance for Industry: Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers | FDA

Další literatura u autora nebo na webu www.csfarmacie.cz