

METODY DETEKCE PYROGENNÍCH LÁTEK

MUDr. Eva Vítková, CSc.
SÚKL, Praha

Obsah sdělení

- Pyrogenita/horečka
- Zkouška na pyrogenní látky
- Bakteriální endotoxiny
- Zkouška aktivace monocytů

Pyrogenita/horečka

- 🕒 **Horečka** je vzestup tělesné teploty nad 38 °C
- 🕒 Horečka je způsobena vyplavením **endogenních pyrogenů** do cirkulace
- 🕒 Mikroorganismy a jejich toxiny působí jako **exogenní pyrogeny** a stimulují uvolňování endogenních pyrogenů.
- 🕒 **endogenní pyrogeny** řadíme: interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF) a interferony uvolňované monocyty, makrofágy

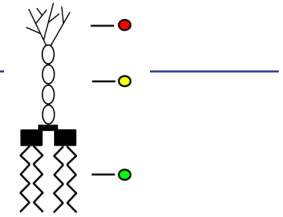


2.6.8. Zkouška na pyrogenní látky


☞ Zkouška spočívá v měření vzestupu tělesné teploty vyvolaného u králíků intravenózní injekcí sterilního roztoku zkoušené látky.

Výhody: tradiční metoda založená na podobné reakci zvířecího organismu na přítomnost pyrogenu/ů v organismu

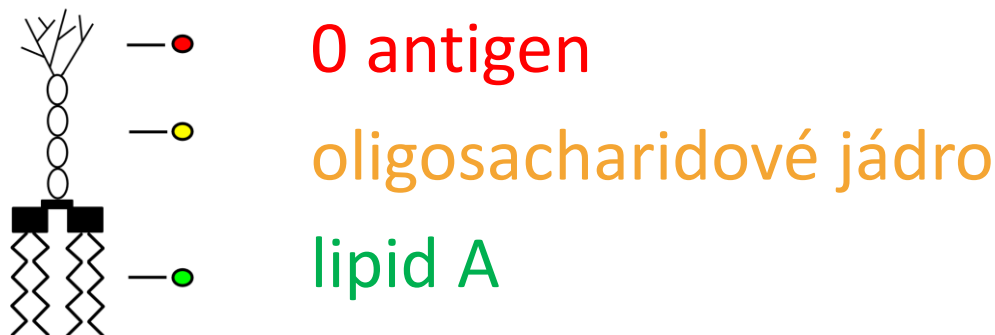
Nevýhody: laboratorní zvíře (**3R**), čas, ekonomicky náročné, nutnost zaškolení personálu, nutnost trénování používaných laboratorních zvířat.

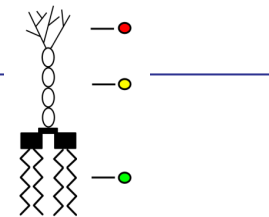


2.6.14 Bakteriální endotoxiny

 Bakteriální endotoxin = lipopolysacharid (LPS)
součást vnější stěny gramnegativních bakterií

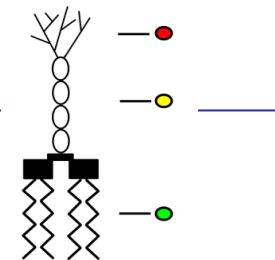
Složení:





2.6.14 Bakteriální endotoxiny

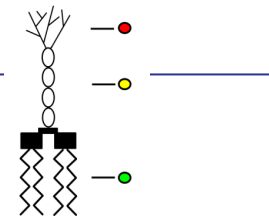
- ☉ 0 antigen: oligosacharidové podjednotky, aktivní část LPS nesoucí antigenní determinanty → podíl na virulenci bakterií
- ☉ Oligosacharidové jádro: krátký řetězec cukrů
- ☉ Lipid A: fosforylovaný N-acetylglukosaminový dimer
toxicita



2.6.14 Bakteriální endotoxiny

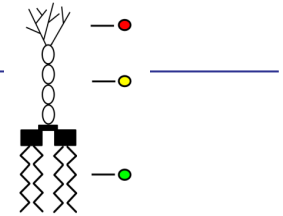
🌀 Zkouška na bakteriální endotoxiny (BET) se používá k detekci nebo kvantitativnímu stanovení endotoxinů pocházejících z gramnegativních bakterií za použití lyzátu z amebocytů ostrorepa (*Limulus polyphemus* nebo *Tachypleus tridentatus*).

Princip: působením endotoxinu aktivace Faktoru C →
aktivace pro-srážecího enzymu → srážecí enzym →
vznik gelu



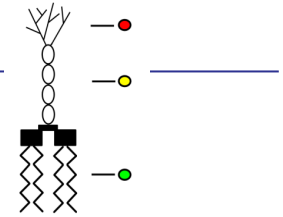
Podmínky zkoušky

- Technické vybavení laboratoře + materiál
- Validace: průkaz nepřítomnosti interferujících faktorů, průkaz nepřítomnosti neendotoxinových pyrogenů, posouzení rizika



3 Posouzení rizika

- 👁 Výrobní proces
- 👁 Biozátěž
- 👁 Schopnost dalšího zpracování
- 👁 Bezpečnost
- 👁 Stabilita detekovatelného endotoxinu



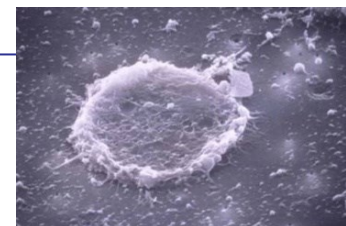
12. NÁHRADA ZKOUŠKY PŘEDEPSANÉ V ČLÁNKU

12-1 NÁHRADA JINOU LÉKOPISNOU METODOU

Pravidlo: Validace podle požadavků uvedených ve zkoušce;
možná náhrada: **2.6.30 Zkouška aktivace monocytů**

12-2 NÁHRADA JINOU ALTERNATIVNÍ METODOU NEUVEDENOU V LÉKOPISE

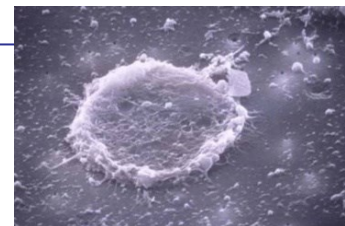
rekombinantní faktor C (rFC) – nahrazuje amebocytární lyzát
získávaný ze živých zvířat (**3R**)



Monocyt


2.6.30 Zkouška aktivace monocytů

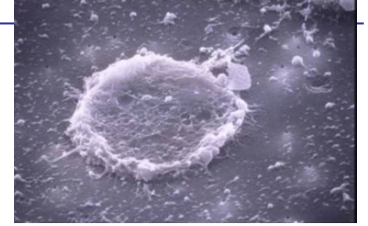
☉ Zkouška aktivace monocytů (MAT) se používá k detekci nebo kvantitativnímu stanovení látek, které aktivují lidské monocyty nebo monocytární buňky k uvolňování endogenních mediátorů, jako jsou prozánětlivé cytokiny, např. tumorový nekrotický faktor alfa ($\text{TNF}\alpha$), interleukin-1-beta ($\text{IL-1}\beta$) a interleukin-6 (IL-6).



Monocyt

2.6.30 Zkouška aktivace monocytů

 Zkoušku aktivace monocytů je možné použít jako náhradu zkoušky na pyrogenní látky na králících po validaci pro jednotlivý přípravek.

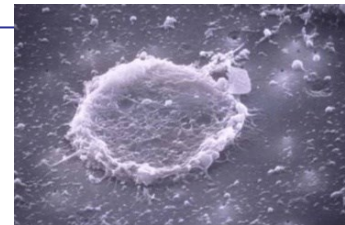


Monocyt

2.6.30 Zkouška aktivace monocytů

Postup zkoušky:

1. zkoušený vzorek se inkubuje s lidskými monocyty nebo lidskými monocytárními buňkami
2. stanoví se množství uvolněných cytokinů

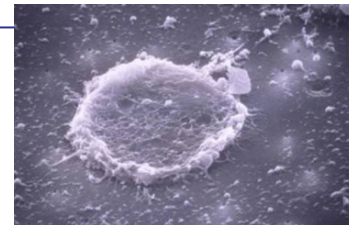


Monocyt

2.6.30 Zkouška aktivace monocytů

 Podmínky zkoušky:

- kvalifikace buněk
- zkouška na interferující faktory
- validace pro jednotlivý přípravek/výběr vhodné metody



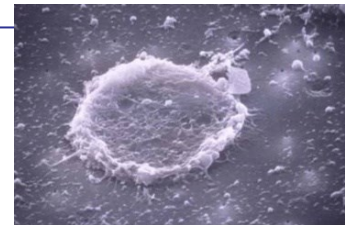
Monocyt

2.6.30 Zkouška aktivace monocytů

Kvalifikace buněk:

- kvalifikace dárců
- kvalifikace buněk spojených od více dárců
- kvalifikace zmrazených buněk
- kvalifikace kontinuálních linií monocytů

+ průkaz vnímavosti k neendotoxinovým pyrogenům
(LPS pro TLR4, LTA pro TLR, flagelin)



Monocyt

2.6.30 Zkouška aktivace monocytů

Závěr

- Zkouška aktivace monocytů přednostně náhradou zkoušky na pyrogenní látky na králících
- Zkouška aktivace monocytů je určena pro hodnocení produktů, u nichž nelze vyloučit přítomnost neendotoxinových pyrogenů (použití LAL nejisté)
- Pro daný přípravek nutno rozhodnout, doložit a validovat pouze jednu metodu LAL/MAT



Děkuji za pozornost

STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV

Šrobárova 48, 100 41 Praha 10

tel.: +420 272 185 111

fax: +420 271 732 377

e-mail: posta@sukl.cz