

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Doris Delač
867/BPI

**ODREĐIVANJE SADRŽAJA
BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINA
U INJEKCIJAMA AZITROMICINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković te mr. sci. Tatjane Turčinov, dipl. inž. med. biokem. u Kontrolni kvalitete PLIVA Hrvatska.

Zahvaljujem se mr. sci. Tatjani Turčinov, dipl. inž. med. biokem. koja mi je omogućila izradu ovog rada u Plivi Hrvatska te mi tijekom cijelog vremena izrade i pisanja rada pružala podršku i pomoć.

Zahvaljujem se i dipl. inž. Ljubici Cerovečki i dipl. inž. Iri Blekić Prgomet te svim ostalim djelatnicima Biološkog laboratorija Kontrole kvalitete u Plivi Hrvatska na pomoći kod provedbe eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala mojoj dragoj profesorici i mentorici prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković na lijepim riječima, strpljenju te velikoj pomoći pri oblikovanju ovog rada.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji i Dinku na ljubavi, strpljenju i podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ODREĐIVANJE SADRŽAJA BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINA U INJEKCIJAMA AZITROMICINA

Doris Delač, 867/BPI

Sažetak: Sadržaj bakterijskih endotoksina u uzorcima injekcija azitromicina određen je kinetičkom turbidimetrijskom metodom i brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru. Kinetička turbidimetrijska metoda je prije analize validirana ispitivanjem utjecaja uzorka na inhibiciju ili pojačanje vrijednosti u testu za određivanje bakterijskih endotoksina. Iako je kinetička turbidimetrijska metoda, metoda izbora za kvantitativno određivanje sadržaja bakterijskih endotoksina, brza metoda na prijenosnom spektrofotometru zahtjeva kraće vrijeme analize. Upravo zbog toga je potrebno usporediti ove dvije metode i dokazati da je i brza metoda na prijenosnom spektrofotometru valjana.

Ključne riječi: bakterijski endotoksini, kinetička turbidimetrijska metoda, prijenosni spektrofotometar

Rad sadrži: 40 stranica, 10 slika, 6 tablica, 43 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. *Ivana Radojčić Redovniković*

Pomoć pri izradi: mr. sci. *Tatjana Turčinov*, dipl. inž. med. biokem.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Višnja Gaurina Srček
2. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. Prof. dr.sc. Ksenija Markov
4. Prof.dr.sc. Jadranka Frece (zamjena)

Datum obrane: 14. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

DETERMINATION OF BACTERIAL ENDOTOXIN CONTENT IN AZITHROMYCIN INJECTION

Doris Delač, 867/BPI

Abstract: Bacterial endotoxin content in Azithromycin injection is determined by kinetic turbidimetric method and with portable test system (PTS). Before the analysis the kinetic turbidimetric method has been validated by examining the influence of sample on inhibition/enhancement in test. The kinetic turbidimetric method is the method of choice for determination of bacterial endotoxin, but PTS method demands shorter determination time. That is why it is necessary to compare these two methods and prove that PTS method is also valid.

Keywords: *bacterial endotoxins, kinetic turbidimetric method, portable test system*

Thesis contains: 40 pages, 10 figures, 6 tables, 43 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Ph. D. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor

Technical support and assistance: mag. ing. med. biochem. *Tatjana Turčinov*, M. Sc.

Reviewers:

1. Ph.D. *Višnja Gaurina Srček*, Full professor
2. Ph.D. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
3. Ph.D. *Ksenija Markov*, Full professor
4. Ph.D. *Jadranka Frece*, Full professor

Thesis defended: July 14th 2017

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BAKTERIJE.....	3
2.2. BAKTERIJSKI TOKSINI	5
2.2.1. Bakterijski egzotoksini	5
2.2.2. Bakterijski endotoksini – lipopolisaharidi gram - negativnih bakterija	6
2.3. BAKTERIJSKI ENDOTOKSINI U FARMACEUTSKOJ PROIZVODNJI – DEPIROGENIZACIJA	9
2.4. ANALITIKA BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINA	10
2.4.1. Bakterijski endotoksini – kinetička turbidimetrijska metoda	11
2.4.2. Bakterijski endotoksini – brza metoda na prijenosnom spektrofotometru	12
2.5. VALIDACIJA METODE	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Uzorci.....	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Oprema	15
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Shema eksperimentalnog rada	17
3.2.2. Depirogenizacija potrebnog pribora	18
3.2.3. Postupak validacije metode	18
3.2.3.1. Provjera standardne krivulje	18
3.2.3.2. Preliminarni test	18
3.2.3.3. Test inhibicije i pojačanja	20
3.2.3.4. Interpretacija rezultata testa na interferirajuće faktore	20
3.2.4. Određivanje bakterijskih endotoksina u injekcijama azitromicina kinetičkom turbidimetrijskom metodom	21
3.2.4.1. Priprema otopine uzorka injekcije azitromicina.....	21
3.2.4.2. Priprema otopine standarda	21
3.2.4.3. Priprema otopine lizata	22
3.2.4.4. Postupak pripreme mikrotitarske pločice za provođenje testa	22
3.2.4.5. Detekcija i kvantifikacija endotoksina spektrofotometrom.....	22
3.2.5. Određivanje bakterijskih endotoksina u injekcijama brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru	25
3.2.5.1. Priprema otopine uzorka injekcije azitromicina.....	25
3.2.5.2. Postupak pripreme instrumenta i opreme za određivanje.....	25

4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. VALIDACIJA KINETIČKE TURBIDIMETRIJSKE METODE	30
4.2. USPOREDBA REZULTATA DETEKCIJE BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINA KINETIČKOM TURBIDIMETRIJSKOM METODOM I BRZOM METODOM NA PRIJENOSNOM SPEKTROFOTOMETRU	35
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Farmaceutska industrija proizvodi lijekove za liječenje i održavanje zdravlja. Asortiman farmaceutskih tvrtki je raznolik. Neke se bave specijaliziranom proizvodnjom lijekova na recept kao što su razni antiinfektivni lijekovi, lijekovi za onkološka oboljenja ili lijekovi za kardiološka oboljenja, a neke tvrtke i proizvodnjom bezreceptnih lijekova (PLIVA, 2017). Neovisno o tome o kojoj se vrsti lijeka radi, aplikacija lijeka može biti s lokalnim ili resorpcijskim djelovanjem. Aplikacija s resorpcijskim djelovanjem može biti indirektna preko sluznica probavnog sustava, preko respiratornog sustava ili preko kože te direktna (injekciona) u venu, u mišić ili pod kožu. Aplikacija s lokalnim djelovanjem podrazumijeva primjenu na kožu i dostupne sluznice, primjenu kroz prirodne otvore te primjenu injekcijom (Šokota i Kalauz, 2008).

Upravo kod aplikacije lijeka injekcijom, posebnu pažnju treba dati sterilnosti tih pripravaka. Pripravci koji se koriste za injekcije i infuzije moraju biti potpuno sterilni i bez prisutnih pirogena. Takvi se pripravci nazivaju parenteralni pripravci. Njihova se kvaliteta ispituje na kraju proizvodnje, ali se i prije proizvodnje ispituju sve sirovine i oprema koja se koristi u proizvodnji (Venkateswara Reddy i sur., 2013).

Pirogeni koji mogu kontaminirati ovakve pripravke jesu bakterijski endotoksini. Sastojci su stanične stijenke gram – negativnih bakterija koja se sastoji od unutarnje i vanjske membrane. Upravo lipopolisaharid koji je sastojak vanjske membrane, ima toksično djelovanje. Ukoliko se nađu u parenteralnim pripravcima, bakterijski endotoksini mogu uzrokovati povišenje temperature, anafilaktički šok i smrt. Zbog toga je vrlo važno provoditi redovite analize sirovina koje se koriste u proizvodnji parenteralnih pripravaka, ali i analize gotovih proizvoda.

Za određivanje bakterijskih endotoksina koriste se metode na temelju *Limulus* - amebocitnog lizirajućeg testa (LAL testa). To mogu biti gel – clot metoda ili spektrofotometrijske metode kao što su kinetička turbidimetrijska metoda i kinetička kromogena metoda (Ogawa, 1994). Kinetička turbidimetrijska metoda temelji se na mjerenju optičke gustoće, odnosno zamućenja koje je u kvantitativnom odnosu s koncentracijom endotoksina. Da bi mogli provoditi analize s ovom metodom, potrebno ju je validirati,

odnosno ispitati utjecaj uzorka na inhibiciju i pojačanje u testu. Kinetička kromogena metoda se temelji na mjerenju inteziteta boje koji je proporcionalan s koncentracijom endotoksina u uzorku (Sandle, 2016). Prijenosni spektrofotometar radi na principu kinetičke kromogene metode (Suzuki i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je validacija kinetičke turbidimetrijske metode te usporedba rezultata te metode i brze metode na prijenosnom spektrofotometru za određivanje bakterijskih endotoksina.

2. TEORIJSKI DIO

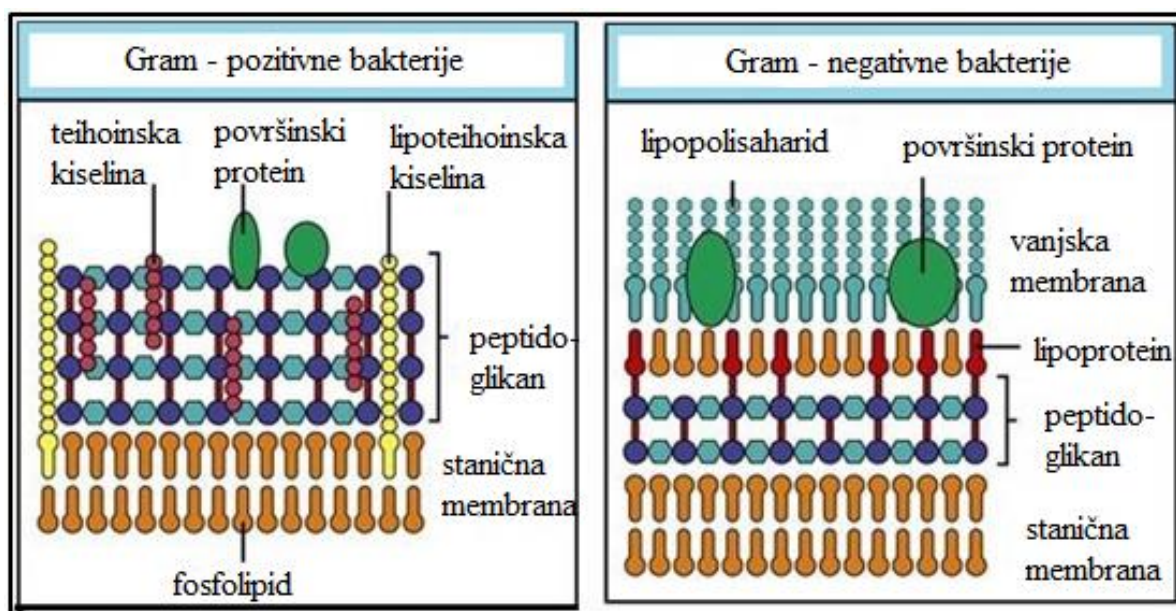
2.1. BAKTERIJE

Bakterije su mali jednostanični organizmi koje je moguće vidjeti pomoću svjetlosnog, fluorescentnog i elektronskog mikroskopa jer im je prosječan promjer stanice oko 1 μm . Nastanjuju sve vrste staništa pa čak i one s ekstremnim uvjetima (prekomjerno zračenje, tlak, slanost itd.). Stanična struktura bakterija je vrlo jednostavna. Čini ju prstenasta dvolančana molekula DNA (nukleoid), ribosomi, plazmatska membrana, stanična stijenka te u nekih bakterija polisaharidna kapsula. Bakterije se često koriste u genetičkim istraživanjima kao modelni organizmi i to upravo zato što imaju jednostavnu građu, kratak životni ciklus (dijele se svakih 30 - 40 minuta), odlikuju se brzim rastom, jednostavnim uzgojem u laboratoriju i raznolikošću fenotipa (Pavlica, 2012).

Na temelju metode bojanja bakterija po Gramu, razlikujemo dvije velike skupine bakterija: gram - pozitivne i gram - negativne bakterije. Metoda je nazvana prema danskom znanstveniku Hansu Christianu Gramu koji 1884. godine uvodi ovu tehniku, vrlo važnu za identifikaciju bakterija. Razlika između gram - pozitivnih i gram - negativnih bakterija očituje se u sastavu stanične stijenke bakterija (Jawetz i sur., 2012). Gram – negativne bakterije se od gram – pozitivnih bakterija razlikuju po debljini peptidoglikanskog sloja (Brown i sur., 2015). Debljina peptidoglikanskog sloja kod gram – negativnih bakterija je varijabilna, ovisno o rodu bakterija, ali je peptidoglikanski sloj kod gram – negativnih bakterija puno tanji od istoga kod gram – pozitivnih bakterija (Duraković, 1991) (slika 1). Uglavnom sloj peptidoglikana kod gram – negativnih bakterija čini do 10% ukupne mase stanične stijenke (Schleifer i Kandler, 1972).

Gram - negativne bakterije imaju plazmatsku membranu, periplazmatski sloj, staničnu stijenku koju čine peptidoglikani i vanjsku liposaharidnu membranu. Vanjsku membranu čine liposaharidi (endotoksini), toksični za ljude i životinje (Todar, 2012). Peptidoglikan (murein) kao glavni sastojak stanične stijenke bakterija sastoji se od ponavljajućih jedinica disaharida *N* - acetilglukozamina i *N* - acetilmuraminske kiseline koje su povezane β - 1, 4 - glikozidnom vezom te proteinskog dijela kojeg čine alanin, glutaminska kiselina, lizin i diaminopimelinska kiselina (Silhavy i sur., 2010).

Pojedini slojevi stanične stijenke nosioci su antigenih determinanata površinskog dijela stanice, a lipopolisaharid u staničnim stijenkama gram - negativnih bakterija sjedište je njihove nespecifične endotoksične aktivnosti (Jawetz i sur., 2012).



Slika 1. Usporedba stanične stijenke gram - pozitivnih i gram - negativnih bakterija (Murphy i Janeway, 2008)

Bakterije imaju brojna pozitivna svojstva i zbog toga su vrlo važne za ljude. Koriste se u industriji proizvodnje hrane, antibiotika, probiotika, lijekova, cjepiva, starter kultura, insekticida, enzima, goriva i otapala. Također, bakterije se mogu genetički transformirati na način da stvaraju različite supstancije koje se mogu koristiti kao pomoćni sastojci u industriji hrane, agronomiji i medicini. Osim mnogih spomenutih pozitivnih načina primjene, bakterije imaju i negativne učinke na čovjeka i industriju i to posebice farmaceutsku (Todar, 2012). Problem koji će se razmatrati u ovome radu je upravo kontaminacija endotoksinima kao sastojcima stanične stijenke gram – negativnih bakterija u proizvodnji parenteralnih lijekova (Ryan, 2008).

2.2. BAKTERIJSKI TOKSINI

Bakterijske toksine može se podijeliti u dvije skupine. To su egzotoksini i endotoksini. Egzotoksini se izlučuju izvan bakterijske stanice, dok su endotoksini dio stanične stijenke gram - negativnih bakterija (Vraneš, 2013).

2.2.1. Bakterijski egzotoksini

Bakterijski egzotoksini su produkti različitih gram - pozitivnih i gram - negativnih bakterija, po kemijskom sastavu su polipeptidi, a geni koji kodiraju za njihovu sintezu se često nalaze na plazmidima ili ih prenose bakteriofagi. Ubrajaju se među najtoksičnije poznate supstancije, čije letalne doze za ljude mogu biti manje od 1 μ g. Međutim, s obzirom da su po sastavu polipeptidi, dobri su antigeni i induciraju sintezu protutijela koja se nazivaju antitoksini. Izlaganjem djelovanju formaldehida, kiselina ili visokih temperatura egzotoksini postaju neškodljivi i nazivaju se toksoidi ili anatoksini te se upotrebljavaju u svrhu aktivne imunizacije kao cjepiva.

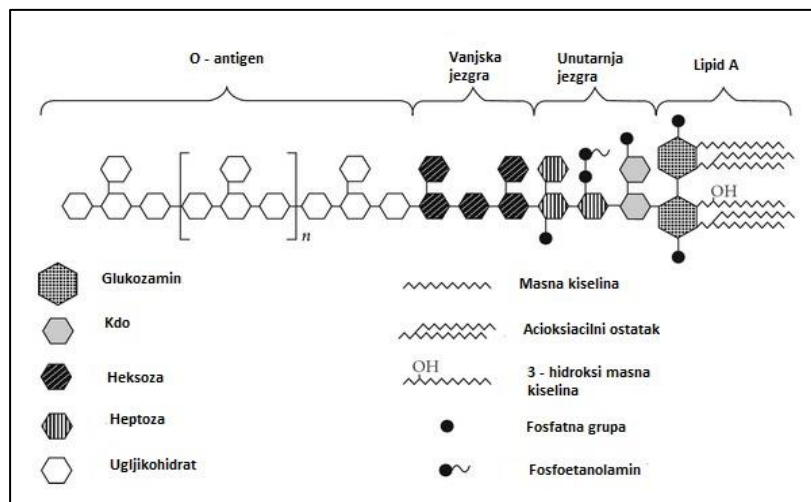
Egzotoksini napuštaju bakterijsku stanicu pomoću specijaliziranih struktura koje se nazivaju sekrecijski sustavi. Neki sekrecijski sustavi izlučuju egzotoksine u izvanstanični prostor, dok ih drugi izlučuju izravno u stanice sisavaca. Sekrecijski sustavi koji izravno izlučuju toksine u stanice posebno su učinkoviti jer na taj način toksini nisu izloženi protutijelima u izvanstaničnom prostoru pa ne mogu biti neutralizirani te njihovo djelovanje nije umanjeno. Mnogi egzotoksini građeni su od dvije podjedinice i nazivaju se A - B toksini. Aktivna (A) podjedinica odgovorna je za toksičnu aktivnost, dok je B podjedinica ta koja veže egzotoksin za specifične receptore na membranama stanica ljudskog organizma. Važni egzotoksini koji su građeni na ovom principu su primjerice difterijski toksin, kolera - toksin, tetanus - toksin, botulinum - toksin i enterotoksin bakterije *Escherichia coli* (Vraneš, 2013).

Postoje različite vrste egzotoksina, a neke od njih jesu: egzotoksin iz bakterije *Clostridium botulinum* koji uzrokuje otrovanje hranom, egzotoksin iz bakterije *Vibrio cholerae* koji proizvodi enterotoksin koleragen, egzotoksin iz bakterije *Corynebacterium diphtheriae* koji izaziva degenerativne promjene na srčanom mišiću te toksin iz bakterije *Clostridium tetani* koji sadrži dvije komponente; tetanospazmin koji je odgovoran za grčenje

poprečno - prugastih mišića, te tetanolizin, koji djeluje na crvena krvna tjelešca (Duraković, 1991).

2.2.2. Bakterijski endotoksini – lipopolisaharidi gram - negativnih bakterija

Endotoksini su otrovi koji spadaju u skupinu pirogena – supstancija koje proizvode bakterije i koje kod ljudi i eksperimentalnih životinja uzrokuju povišenje tjelesne temperature i mnoge druge komplikacije (Beeson, 1947). Za razliku od egzotoksina, endotoksini ne nastaju kao produkt izlučivanja bakterija već su oni strukturalni dijelovi stanične stijenke gram - negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* itd.) neovisno radi li se ili ne o patogenom soju bakterije (Todar, 2012). Po kemijskoj strukturi, endotoksini su lipopolisaharidi koji se sastoje od O - antigena i lipida A (Rietschel i sur., 1994). Upravo lipid A predstavlja toksični dio endotoksina. Sastoji se od nekoliko masnih kiselina čiji sastav ovisi o vrsti bakterije (slika 2). Polisaharidna jezgra u sredini molekule nalazi se na površini bakterijske stanice i istog je sastava kod svih pripadnika nekog roda, dok se na nju nastavlja polisaharidni lanac karakterističan za svaku bakterijsku vrstu, a često karakterističan i za pojedini soj unutar vrste (Vraneš, 2013).



Slika 2. Struktura endotoksina (lipopolisaharida) (Lodowska i sur., 2011)

Endotoksini su po svome sastavu termostabilni liposaharidi molekularne mase od 1000 do 25000 Da (Sandle, 2016). Ukoliko ih usporedimo s egzotoksinima, endotoksini su puno manje opasni (Todar, 2012). Učinci endotoksina su nespecifični (Duraković, 1991). Stabilni su na temperaturi vrenja čak 30 minuta. Iako ih djelovanje visoke temperature neko vrijeme ne destabilizira, neki oksidansi kao što su peroksid, superoksid ili hipoklorit neutraliziraju njihovo djelovanje (Todar, 2012).

Oslobađaju se u okolinu stanice kada bakterija lizira (Jawetz i sur., 2012), a u ljudskom su tijelu odgovorni za aktivaciju imunološkog sustava odnosno otpuštanje fragmenata membrane koji sadržavaju lipid A u krvotok, uzrokujući tako povišenje temperature, dijareju i sepsu (Sandle, 2016).

Kada se unesu u organizam, endotoksini imaju toksične i pirogene učinke (Duraković, 1991). Neki od učinaka jesu povećanje tjelesne temperature u čovjeka ili životinje, proširenje zjenica, bolovi u mišićima, povećanje krvnog tlaka itd. (Sandle, 2016). Biološka aktivnost endotoksina, vezana je za lipopolisaharid (Todar, 2012). Patofiziološki učinci lipopolisaharida su slični bez obzira na njihovo bakterijsko podrijetlo, osim endotoksina *Bacteroides* vrste, koji imaju drugačiju strukturu i koji su manje toksični (Jawetz i sur., 2012).

Kada se lipopolisaharid podijeli u lipid A i polisaharid, sva toksičnost je povezana s njegovom lipidnom komponentom (Jawetz i sur., 2012). S polisaharidnom komponentom je povezana imunogenost. Antigeni staničnog zida gram - negativnih bakterija su O – antigeni (Todar, 2012). O – antigeni predstavljaju ponavljajući polimer oligosaharidnih jedinica (Wang i sur., 2010). Lipid A je fosfoglikolipid čija struktura ovisi o vrsti bakterije. Sve molekule lipida A sadrže D – glukopiranozidne heksoaminske ostatke koji postoje kao dimeri povezani $\beta - 1,6$ - vezama.

Budući je lipid A zatvoren u vanjskoj membrani bakterijske stanice, jedini način da se oslobodi je prilikom umnažanja ili smrti bakterijske stanice. Zbog njegove strukture, povezan je preko receptora (TLR4) na imunološke stanice (monocite, makrofage, neutrofile i dendritske stanice) i tako ih može stimulirati da izlučuju upalne citokine (Doerrler, 2006).

Egzotoksini i endotoksini imaju mnoge razlike koje se očituju u njihovim karakteristikama i djelovanju. Razlike između egzotoksina i endotoksina su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike egzotoksina i endotoksina (Jawetz, 2012; Duraković, 1991)

EGZOTOKSINI	ENDOTOKSINI
Luče ih žive stanice; nalaze se u visokim koncentracijama u tekućoj podlozi	Oslobađaju se autolizom ili na neki drugi način razaranjem stanice
Proizvode ih Gram - pozitivne i Gram - negativne bakterije	Sastavni su dio stanične stijenke Gram - negativnih mikroorganizama
Polipeptidi molekularne težine 10.000 – 900.000 Da	Kompleksi lipolisaharida; lipid A vjerojatno odgovoran za toksičnost
Relativno nestabilni; toplina iznad 60 °C često im brzo uništava toksičnost.	Relativno stabilni; satima podnose temperaturu iznad 60 °C bez gubitka toksičnosti.
Jako antigenični; stimuliraju stvaranje antitoksina visokog titra. Antitoksin neutralizira toksin.	Slabo imunogenični; protutijela su antitoksična i zaštitna; veza između titra antitijela i zaštite od bolesti je manje jasna nego za egzotoksine.
Formalin, kiseline, toplina itd., ih mijenjaju u antigenične. Toksoidi se koriste kao cjepiva.	Ne mijenjaju se u toksoide.
Jako toksični; smrtonosni za laboratorijske životinje u µg ili manjim jedinicama.	Slabo toksični; smrtonosni za laboratorijske životinje u stotinama µg.
Obično se vežu na specifične receptore na stanici.	Specifični receptori se ne nalaze na stanici.
Ne izazivaju povišenu temperaturu u domaćina.	Često izazivaju povišenu temperaturu u domaćina.
Često su kontrolirani ekstrakromosomalnim genima (npr. plazmidi)	Sintezu usmjeravaju kromosomalni geni.

2.3. BAKTERIJSKI ENDOTOKSINI U FARMACEUTSKOJ PROIZVODNJI – DEPIROGENIZACIJA

Kontaminacija u farmaceutskim proizvodima je veliki problem i izazov za farmaceutsku industriju. Vrste kontaminanata, njihov utjecaj na ljudsko zdravlje, izvor kontaminacije i metode za detekciju i prevenciju su mnogobrojne (Flaum, 1978). Kontaminacija endotoksinima posebno je važna u slučaju parenteralnih proizvoda (lijekova). Parenteralni lijekovi jesu oni koji se pacijentu daju injekcijom, dakle daju se kroz kožu, mišić ili direktno u krvožilni sustav (Groves, 1969).

U farmaciji se sterilizacija koristi za eliminaciju mikroorganizama, međutim njome se ne mogu ukloniti sve potencijalne opasnosti koje proizlaze iz mikrobnog rasta (Duraković, 1991). S obzirom da se u proizvodnji bioloških i farmaceutskih proizvoda sve više koriste različite proteinske komponente za medicinske i terapijske svrhe, velika je potreba za procesom koji može eliminirati kontaminaciju pirogenima (Shanbrom, 1982). Isto tako, kao preduvjet ispravnih rezultata analize tijekom ispitivanja bakterijskih endotoksina potrebno je za analizu osigurati apirogeno suđe i pribor. Taj se postupak pripreme apirogenog suđa i ostalog pribora naziva depirogenizacija (PLIVA, 2016).

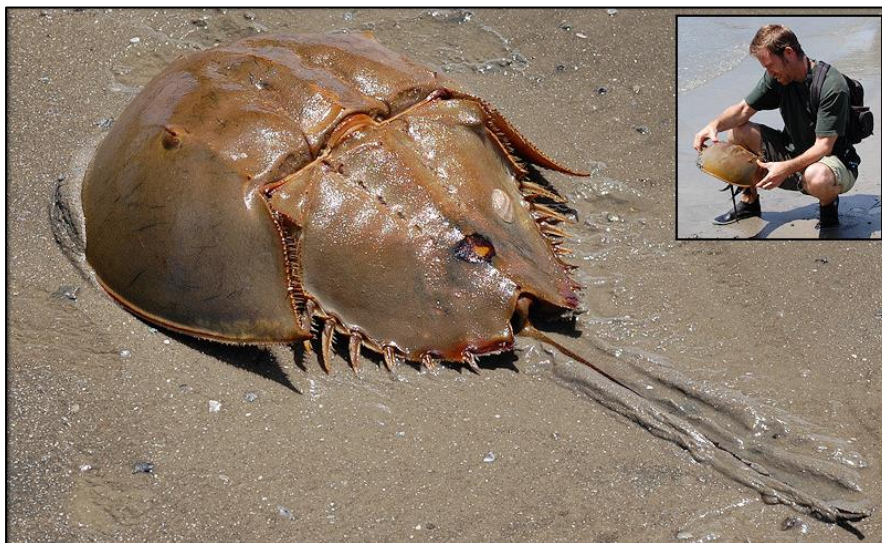
Međutim, pirogene je vrlo često teško ukloniti iz otopine zbog razlike u njihovoj molekularnoj masi. Osim toga, termički su stabilni te podnose velike promjene pH vrijednosti. Upravo zbog toga što je pirogene teško ukloniti, inaktivacija i destrukcija liposaharidnih molekula koje su odgovorne za endotoksično djelovanje je moguće rješenje (El - Magdy Salama i Mobarez, 2015).

2.4. ANALITIKA BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINA

Zbog posljedica koje po zdravlje čovjeka može izazvati prisustvo bakterijskih endotoksina, prema farmakopejskim zahtjevima, kao jedan od uvjeta za puštanje lijeka za parenteralnu upotrebu u promet, potrebno je ispitivanje prisustva, odnosno određivanje količine bakterijskih endotoksina u njima. Za veliki broj parenteralnih proizvoda postoje farmakopejski zahtjevi ili zahtjevi proizvođača za maksimalno dozvoljeni sadržaj bakterijskih endotoksina u njima (Arambašić, 2011).

Metode za određivanje bakterijskih endotoksina su mnogobrojne. Test sa zečevima bio je prvi korišteni test za detekciju endotoksina. Temelji se na povećanju tjelesne temperature zečeva uslijed intravenoznog injektiranja otopine s endotoksinima. Mane ovog testa jesu što je vrijeme detekcije endotoksina dugačko, test je financijski neisplativ i treba izbjegavati testove na eksperimentalnim životinjama (Wenquiong i Xianting, 2015).

Zbog spomenutih mana, 1968. godine je test sa zečevima zamijenjen testom koji se provodi pomoću *Limulus* - amebocitnog lizirajućeg testa (LAL test). Test se zasniva na činjenici da lizat - vodeni ekstrakt amebocita iz krvi račića *Limulus polyphemus* (slika 3) sadrži enzim koji se aktivira u prisutnosti vrlo male koncentracije endotoksina i dvovalentnih kationa, kao što su kalcij i magnezij. Konačan je rezultat tih reakcija tvorba mutnoga gela. Upravo ta reakcija između endotoksina i lizata omogućava detekciju bakterijskih endotoksina (Duraković, 1991).



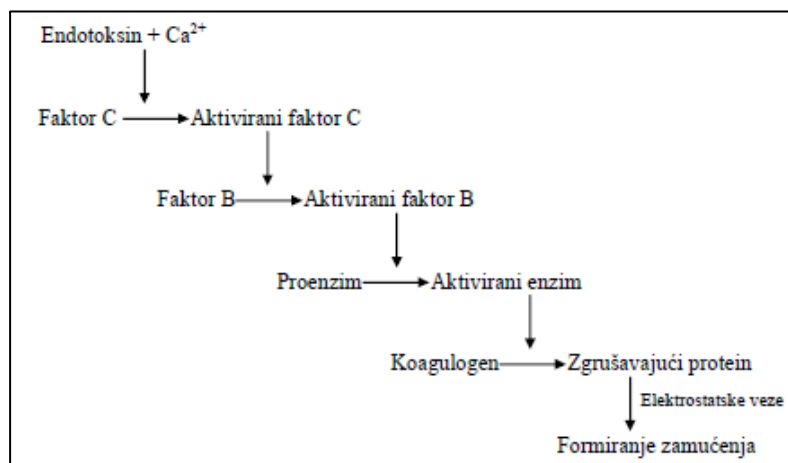
Slika 3. *Limulus polyphemus* (Anonymous 1, 2013)

Metode koje se temelje na LAL testu jesu gel - clot metoda i dvije fotometrijske metode: kinetička turbidimetrijska metoda i kinetička kromogena metoda (Sandle, 2016).

2.4.1. Bakterijski endotoksini – kinetička turbidimetrijska metoda

Turbidimetrijska metoda dijeli se na kinetičku turbidimetrijsku metodu i turbidimetrijsku end – point metodu. Kinetička turbidimetrijska metoda se temelji na mjerenju vremena (reakcijsko vrijeme) potrebnog da reakcijska smjesa postigne unaprijed definiranu vrijednost apsorbancije (tj. zamućenja, optičke gustoće), dok se turbidimetrijska end - point metoda temelji na kvantitativnom odnosu između koncentracije endotoksina i zamućenja (apsorbancije ili transmisije) u reakcijskoj smjesi na kraju perioda inkubacije.

Turbidimetrijska metoda je zajedno s kromogenom metodom, fotometrijska metoda. Tijekom odvijanja testa, zbog reakcije između lizata i uzorka, dolazi do pojave sve veće zamućenosti. Tijekom reakcije, koncentracija koagulina koji nije topiv i njegovog prekursora koagulogena se smanjuje (slika 4). Ovaj proces uzrokuje povećanje optičke gustoće, a to se povećanje detektira na spektrofotometru. Zamućenje, odnosno povećanje optičke gustoće je proporcionalno koncentraciji endotoksina u uzorku (Sandle, 2016).



Slika 4. Princip kinetičke turbidimetrijske metode (PLIVA, 2014)

2.4.2. Bakterijski endotoksini – brza metoda na prijenosnom spektrofotometru

Brza metoda za određivanje sadržaja bakterijskih endotoksina na prijenosnom spektrofotometru je kinetička kromogena metoda. U metodi se koristi sintetski kromogeni supstrat koji sadržava specifičnu sekvencu aminokiselina koja je dizajnirana tako da oponaša mjesto cijepanja u koagulogenu. Aktivirani enzimi kataliziraju reakciju cijepanja mjesta rascjepa te oslobode kromofora koji je žute boje. Oslobodeni kromofor apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 405 nm te se apsorbirana svjetlost mjeri. Količina apsorbirane svjetlosti je proporcionalna s koncentracijom endotoksina u uzorku (Sandle, 2016).

Prijenosni spektrofotometar (PTS) odobren od FDA - a (Food and Drug Administration), dizajniran je za automatsko, brzo određivanje koncentracije bakterijskih endotoksina u određenom uzorku. Radi na principu kinetičke kromogene metode (Silveira i sur., 2011). Pomoću računalnog programa Endosafe PTS omogućeno je upravljanje instrumentom, provođenje analize, obrada podataka i ispis rezultata putem spojenog pripadajućeg printera (PLIVA, 2015).

2.5. VALIDACIJA METODE

Validacija je definirana kao potvrda ispitivanjem i prikupljanjem objektivnih dokaza o ispunjenju osobnih zahtjeva za predviđenu posebnu uporabu (HRN ISO 8402, 1996). Može se definirati i kao dokumentirani proces u kojem se određuje koliko je određeni mjerni sustav pogodan za dobivanje korisnih podataka (Kaštelan - Macan, 2003).

Kod validacije kinetičke turbidimetrijske metode za određivanje endotoksina, ispituje se izaziva li uzorak koji se analizira na bakterijske endotoksine inhibiciju ili pojačanje u testu za određivanje bakterijskih endotoksina. Za potpunu validaciju metode za određivanje bakterijskih endotoksina potrebno je provesti validacijske testove na ukupno 3 različite serije proizvoda. Validacija podrazumijeva provjeru standardne krivulje i test na interferirajuće faktore (preliminarni test i test inhibicije i pojačanja) (PLIVA, 2013).

Lizat, vodeni ekstrakt amebocita iz krvi račića *Limulus polyphemus* koji u reakciji s endotoksinima rezultira zamućenjem otopine, može interferirati s uzorkom. U tom slučaju, dolazi do lažno pozitivnog ili lažno negativnog testa na bakterijske endotoksine u uzorku. Neke molekule poput trombina ili ribonukleaze mogu reagirati s lizatom i dati pozitivan rezultat LAL testa iako uzrok nisu bakterijski endotoksini u uzorku. Do interferencije s molekulama poput trombina ili ribonukleaze može doći zbog mnogo faktora. Neki od njih jesu pH vrijednost izvan kriterija prihvatljivosti za taj test te prisustvo proteina i kemikalija u uzorku. Pojava inhibicije je veći problem jer je tada rezultat LAL testa lažno negativan, a u uzorku možda ima bakterijskih endotoksina.

Upravo zbog svega navedenog, vrlo je važno pronaći pravo razrijeđenje pri kojem će se obavljati LAL test. Na temelju određenog maksimalnog dozvoljenog razrijeđenja (MVD) do kojeg se uzorak smije razrijediti, određuje se niz drugih razrijeđenja koja se ispituju kako bi se otkrilo pri kojem razrijeđenju dolazi do inhibicije ili pojačanja, odnosno pri kojem dolazi do prevladavanja interferencije. Taj se postupak naziva preliminarni test (Sandle, 2016). Maksimalno dozvoljeno razrijeđenje se određuje uzimajući u obzir endotoksin limit, koncentraciju otopine uzorka i osjetljivost lizata. Endotoksin limit se može izraziti kao omjer konstante (K) koja izražava maksimalnu količinu endotoksina koju čovjek može primiti parenteralnim putem po kilogramu tjelesne težine u jednom satu, bez pojave patoloških

promjena i maksimalne bolus doze produkta koja se može dati po kilogramu tjelesne težine u jednom satu. Konstanta K kod različitih načina aplikacije lijeka ima i različite vrijednosti. U slučaju intravenozne aplikacije, maksimalna količina endotoksina koju čovjek može primiti po kilogramu tjelesne težine u jednom satu je 5 EU. U slučaju intratekalne aplikacije (u leđnu moždinu), K iznosi $0,2 \text{ EU kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a kod intravenozne aplikacije radiofarmaceutskih produkata K se definira prema odgovarajućoj regulativi. Osjetljivost lizata definirana je od strane proizvođača istog (PLIVA, 2013).

Nakon preliminarnog testa, inženjer donosi odluku pri kojem će se razrijeđenju provoditi ispitivanje te isto provjerava u testu inhibicije i pojačanja. Preporuka je da se odabere ono razrijeđenje koje je dovoljno brojčano udaljeno od maksimalnog dozvoljenog razrijeđenja, ali i od razrijeđenja pri kojem je došlo do pojave interferencije (Sandle, 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za ispitivanje sadržaja bakterijskih endotoksina korišteni su uzorci injekcija azitromicina.

3.1.2. Kemikalije

Priprema kontrolnog standarda endotoksina za kinetičku turbidimetrijsku metodu izvedena je prateći proceduru opisanu u dokumentaciji Plive (PLIVA, 2014). Sve kemikalije moraju biti apirogene.

- Kontrolni standard endotoksina (CSE), Charles River Endosafe, odobren od FDA - a (Food and Drug Administration) i CBER - a (Center for Biologics Evaluation and Research). Lot broj: EM34772
- *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) – liofilizirani lizat, Charles River Endosafe, odobren od FDA - a i CBER - a. Lot broj: F4591L
- Magnezijev sulfat (0,5M MgSO₄ u 1,0M TRIS puferu), Charles River Endosafe. Lot broj: L54514
- Ulošci s reagensima (za prijenosni spektrofotometar) osjetljivosti 5 - 0.05 EU mL⁻¹, Charles River Endosafe. Lot broj: 4211180
- Voda za LAL test, Charles River Endosafe. Lot broj: 99732349

3.1.3. Oprema

- Apirogeno, stakleno laboratorijsko suđe, apirogeni plastični spremnici, nastavci za automatske pipetore, nastavci za dispenzere
- Automatski pipetori
- Dispenzeri
- Hladnjak (2 – 8 °C), Kirsch, Njemačka

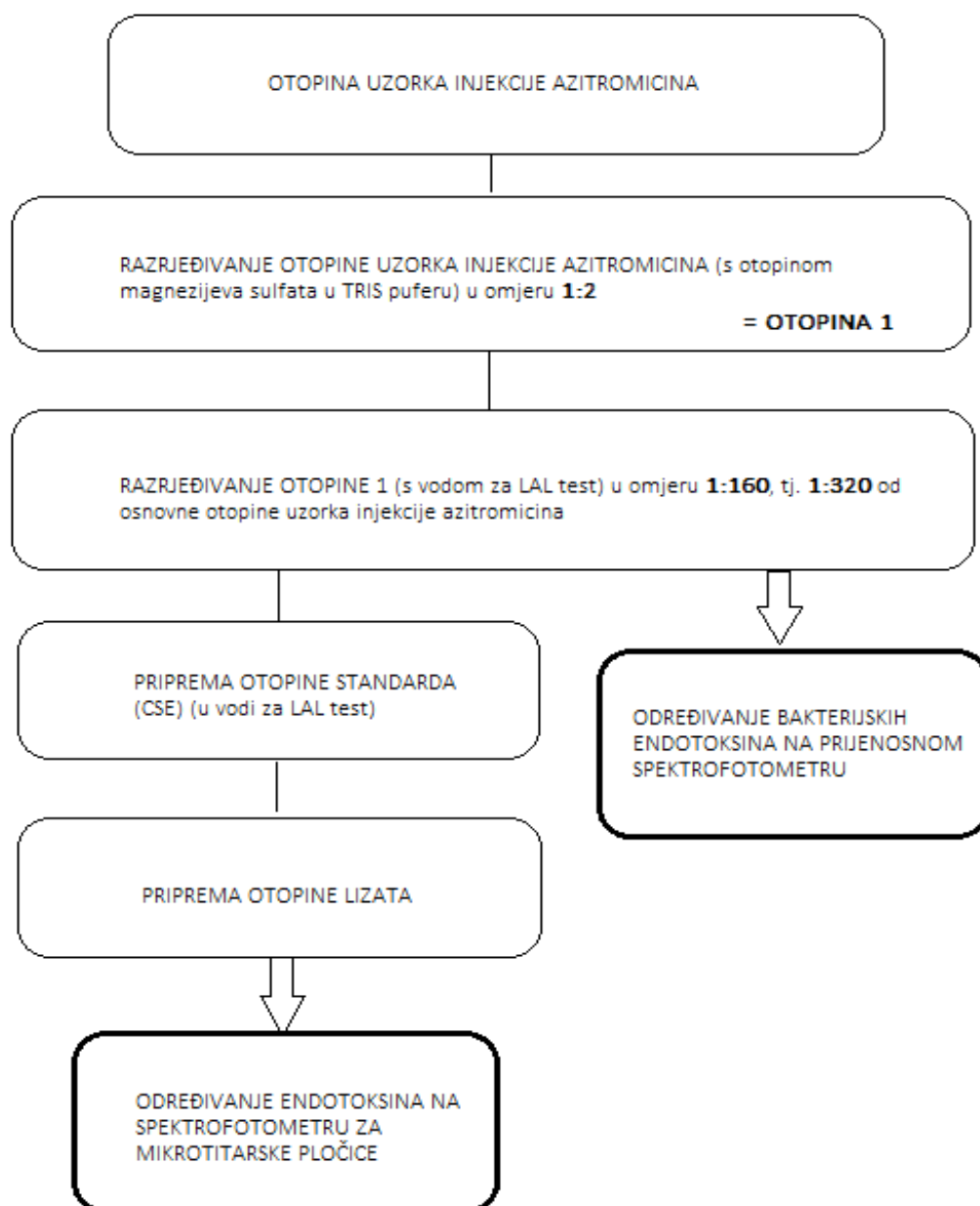
- Polistirenske mikrotitar pločice s 96 jažica s ravnim dnom (certificirane na sadržaj bakterijskih endotoksina: $< 0,005 \text{ EU mL}^{-1}$)
- Prijenosni spektrofotometar (PTS), Charles River, SAD
- Spektrofotometar za mikrotitarske ploče, Bio-Tek EL×808UI s računalnim programom EndoScan-V
- Stalak za epruvete, stalak za mikrotitar pločice, kliješta za otvaranja bočica
- Suhi sterilizator, Kambič, Slovenija
- Ultrazvučna kupelj, Bandelin Sonorex, Njemačka
- Vaga, Mettler Toledo, Švicarska
- Zamrzivač ($< -20 \text{ °C}$), Kirsch, Njemačka

3.2. METODE

Kinetička turbidimetrijska metoda je prethodno validirana, a sav potreban pribor i oprema su depirogenizirani.

3.2.1. Shema eksperimentalnog rada

Shema eksperimentalnog rada prikazana je na slici 5.



Slika 5. Shema eksperimentalnog rada

3.2.2. Depirogenizacija potrebnog pribora

Depirogenizacija se provodi vrućim, suhim zrakom u sterilizatoru, i to pri 250 °C tijekom 30 minuta. Sude se priprema tako da se najprije ispere vodovodnom vodom. Laboratorijsko suđe koje je za potrebe analize kontaminirano bakterijskim endotoksinima, preliminarno se čisti od endotoksina, tako da se potopi u deterdžentu preko noći, a zatim se ispere vodovodnom vodom. Svo laboratorijsko suđe i metalni pribor pere se strojno. Nakon pranja se osušeno laboratorijsko suđe ili pribor zamota u aluminijsku foliju te depirogenizira.

3.2.3. Postupak validacije metode

3.2.3.1. Provjera standardne krivulje

Za provjeru standardne krivulje pripreme se sve standardne koncentracije (5, 0,5 i 0,05 EU mL⁻¹) u 3 paralele. Apsolutna vrijednost koeficijenta korelacije r mora biti veća ili jednaka 0,980.

3.2.3.2. Preliminarni test

Za provođenje preliminarnog testa potrebno je odrediti maksimalno validirano razrijeđenje (MVD). MVD se određuje iz jednadžbe (1):

$$\text{MVD} = \frac{\text{endotoksin limit [EU mg}^{-1}\text{]} * \text{koncentracija osnovne otopine uzorka [mg mL}^{-1}\text{]}}{\text{osjetljivost lizata [EU mL}^{-1}\text{]}} \quad (1)$$

S obzirom da endotoksin limit iznosi 0,35 EU mg⁻¹ prema farmakopejskih zahtjevima, koncentracija osnovne otopine uzorka je 95 mg mL⁻¹, a osjetljivost lizata 0,05 EU mL⁻¹, izračunati MVD iznosi 665. To je maksimalno razrijeđenje do kojeg se uzorak smije razrijediti.

Nakon što je poznato maksimalno dozvoljeno razrijeđenje (MVD), pripreme se razna razrijeđenja uzorka (početne koncentracije 95 mg mL^{-1}) tako što se uzorak razrijedi s $0,5 \text{ M MgSO}_4$ u TRIS puferu, u omjeru 1:2, a zatim se dodavanjem vode za LAL test prirede razrijeđenja: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 i 1:655.

Kontrolni standard endotoksina (CSE), potreban za pripremu standardne krivulje se resuspendira s $5,5 \text{ mL}$ vode LAL test kako bi se postigla koncentracija od 1000 EU mL^{-1} . Ostale koncentracije standarda koje se pripremaju jesu 5 EU mL^{-1} , $0,5 \text{ EU mL}^{-1}$ i $0,05 \text{ EU mL}^{-1}$.

Pozitivna kontrola produkta (PPC) se priprema tako da se uzorku dodaje endotoksin u koncentraciji od 5 EU mL^{-1} .

Negativna kontrola sadržava vodu za LAL test.

U Tablici 2. prikazane su otopine koje se dodaju u jažice na mikrotitarskoj pločici za provođenje testa.

Tablica 2. Prikaz otopina i količina koje se dodaju u jažice za provođenje preliminarnog testa

Standardna krivulja ($5; 0,5; 0,05 \text{ EU mL}^{-1}$)	100 μL endotoksina + 100 μL lizata
Negativna kontrola	100 μL vode za LAL test + 100 μL lizata
Otopine uzorka za preliminarni test (razrijeđenja: 1:1, 1:2, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:655)	100 μL uzorka + 100 μL lizata
Pozitivna kontrola produkta (PPC) konc. $0,5 \text{ EU mL}^{-1}$	100 μL uzorka + 10 μL endotoksina konc. 5 EU mL^{-1} + 100 μL lizata

3.2.3.3. Test inhibicije i pojačanja

Test inhibicije i pojačanja se provodi s onim razrijeđenjima koja ne pokazuju interferencije u testu.

Pripreme se odabrana razrijeđenja, kontrolni standard endotoksina, pozitivna i negativna kontrola kako je objašnjeno u 3.2.3.2. poglavlju. Tablica 3 odnosi se i na test na interferirajuće faktore, tj. dodavanje odgovarajućih otopina u jažice, uz izmjenu razrijeđenja uzorka.

3.2.3.4. Interpretacija rezultata testa na interferirajuće faktore

Da bi test na interferencije bio valjan, moraju biti zadovoljeni točno određeni propisani kriteriji vezani za apsolutnu vrijednost koeficijenta korelacije standardne krivulje, koeficijent varijacije, odnosno reakcijsko vrijeme paralela za standard i uzorak, iskorištenje poznate koncentracije endotoksina dodane u pozitivnu kontrolu produkta (PPC iskorištenje) te koncentraciju endotoksina u svakoj paraleli negativne kontrole za LAL test. Vrijeme reakcije na temelju kojeg se računa koeficijent varijacije (CV) definira se kao vrijeme potrebno da dođe do zamućenja ukoliko je prisutan endotoksin u uzorku (European Pharmacopoeia, 2017b). Koeficijent varijacije (CV) definiran je kao omjer standardne devijacije koncentracije ponovljenih uzoraka i iskorištenja (INSEE, 2017).

3.2.4. Određivanje bakterijskih endotoksina u injekcijama azitromicina kinetičkom turbidimetrijskom metodom

Određivanje bakterijskih endotoksina provodi se prema Plivinim dokumentima za Kinetičku turbidimetrijsku metodu (PLIVA, 2014).

Određivanje endotoksina sastoji se od četiri faze:

1. Priprema otopine uzorka injekcije azitromicina
2. Priprema otopine liofiliziranog radnog standarda
3. Priprema otopine lizata
4. Određivanje na spektrofotometru za mikrotitarske pločice

3.2.4.1. Priprema otopine uzorka injekcije azitromicina

Osnovna otopina uzorka injekcije azitromicina je koncentracije 95 mg mL^{-1} i odgovara originalnoj otopini uzorka injekcije azitromicina. Prvi korak je razrjeđivanje osnovne otopine uzorka s $0,5 \text{ M}$ otopinom MgSO_4 u $1,0 \text{ M}$ TRIS puferu u omjeru 1:2. Na taj se način dobije razrijeđena otopina 1 koncentracije $47,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Sljedeći korak je razrjeđivanje već razrijeđene otopine 1 s vodom za LAL test u omjeru 1:160, odnosno 1:320 od osnovne otopine uzorka injekcije azitromicina.

3.2.4.2. Priprema otopine standarda

Liofilizirani radni standard (CSE) resuspendira se u vodi za LAL test, nakon čega se bočica začepi i miješa barem 5 minuta na miješalici. Za provođenje testa potrebno je pripremiti standardnu krivulju. Za ovaj test pripremljena su razrjeđenja koja odgovaraju 2 - log standardnoj krivulji. 2 - log standardna krivulja se sastoji od 3 točke (5, 0,5 i $0,05 \text{ EU mL}^{-1}$). Koncentracije standarda pripremaju se serijom razrjeđenja u vodi za LAL test iz osnovne otopine standarda. Svaka točka (koncentracija) standardne krivulje razrijeđena je 10 puta u odnosu na prethodnu koncentraciju. Svako razrjeđenje miješa se najmanje 30 sekundi neposredno prije nego se iz njega pripremi sljedeće razrjeđenje.

3.2.4.3. Priprema otopine lizata

S obzirom da se radi o liofiliziranom lizatu, prije početka pripreme otopine, potrebno je protresanjem bočice u kojoj se lizat nalazi prikupiti lizat na dnu bočice. Nakon toga se lizatu u bočici dodaje 5,2 mL vode za LAL test i sadržaj se promiješa.

Tako pripremljena otopina lizata može se čuvati na temperaturi od 2 – 8 °C te se kao takva mora upotrijebiti u periodu od 24 sata.

3.2.4.4. Postupak pripreme mikrotitarske pločice za provođenje testa

Prije početka testa, odnosno umetanja mikrotitarske pločice u odgovarajući spektrofotometar, potrebno je dodati sve potrebne otopine na mikrotitarsku pločicu (ravna pločica s 96 jažica u koje se dodaju potrebne otopine). U četiri jažice se dodaje po 100 µL otopine uzorka injekcije azitromicina. 100 µL otopine standarda svake koncentracije se dodaje u minimalno dvije jažice (dvije paralele) kako bi se priredila standardna krivulja. U jažice za negativnu kontrolu (koja sadrži samo vodu za LAL test, kako bi se potvrdilo da u njoj zaista nema endotoksina) se dodaje 100 µL vode za LAL test, a u jažice za pozitivnu kontrolu (otopina uzorka injekcija azitromicina u koju je dodan endotoksin, kako bi se dokazalo da je metoda ispravna te da pokazuje endotoksine tamo gdje ih ima) se dodaje otopina uzorka injekcija azitromicina u koju je dodan endotoksin i to u takvoj koncentraciji da u konačnici odgovara koncentraciji endotoksina na sredini standardne krivulje. Pozitivna kontrola priprema se tako da se doda po 100 µL otopine uzorka i po 10 µL otopine endotoksin standarda. Na kraju, nakon što se doda sve navedeno, potrebno je u jažice dodati 100 µL resuspendiranog lizata. Dodavanje lizata mora biti brzo, najprije u jažice koje sadrže negativnu kontrolu, a onda u jažice koje sadrže najvišu koncentraciju endotoksina.

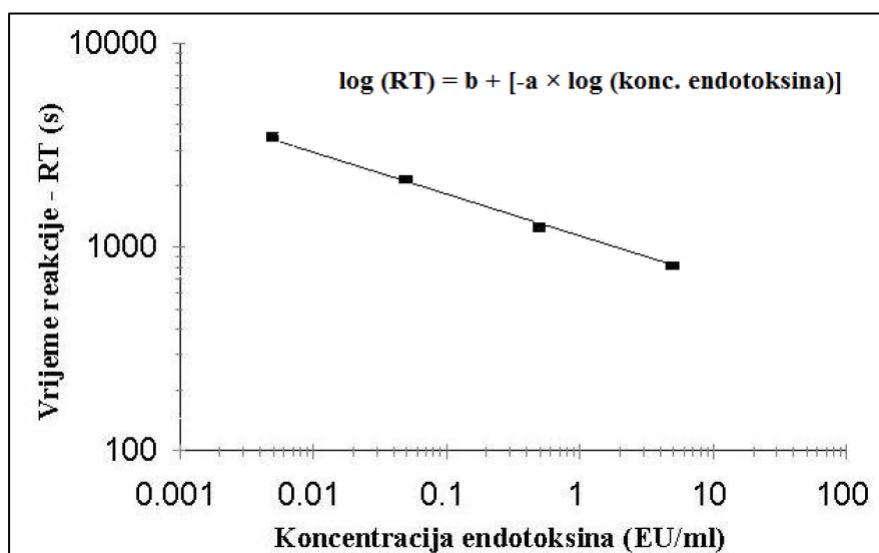
3.2.4.5. Detekcija i kvantifikacija endotoksina spektrofotometrom

Nakon dodavanja lizata, mikrotitarska pločica se stavi u spektrofotometar za mikrotitarske pločice (slika 6) prethodno zagrijan na 37 °C i pokrene se mjerenje optičke gustoće u vremenu kod valne duljine 340 nm.



Slika 6. Spektrofotometar za mikrotitarske pločice (BioTek, 2017)

Iz standardnog pravca ovisnosti vremena reakcije o koncentraciji endotoksina (slika 7) i jednadžbe (2), dobije se koncentracija endotoksina u uzorku:



Slika 7. Standardna krivulja ovisnosti vremena reakcije o koncentraciji endotoksina

$$\text{Koncentracija endotoksina (EU mL}^{-1}\text{)} = \text{anti log} * \left[\frac{\log \text{RT}^{\#} - b}{a} \right] \quad (2)$$

a – nagib pravca

b – odsječak na osi Y

RT – vrijeme reakcije (s)

- vrijeme reakcije koje odgovara srednjoj vrijednosti paralela

Stvarna koncentracija endotoksina u uzorku dobije se iz jednadžbe (3):

$$\text{Stvarna konc. endotoksina (EU mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{izmjerena koncentracija endotoksina u otopini uzorka (EU mL}^{-1}\text{)} * \text{faktor razrijeđenja}}{\text{koncentracija osnovne otopine uzorka mg mL}^{-1}} \quad (3)$$

3.2.5. Određivanje bakterijskih endotoksina u injekcijama brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru

Određivanje bakterijskih endotoksina provodi se prema Plivinim dokumentima za određivanje bakterijskih endotoksina brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru (PLIVA, 2015).

Određivanje endotoksina sastoji se od tri faze:

1. Priprema otopine uzorka injekcije azitromicina
2. Inokulacija otopine uzorka injekcija azitromicina u uloške s reagensima u prijenosni spektrofotometar
3. Umetanje uložaka u PTS instrument i pokretanje rada instrumenta

3.2.5.1 Priprema otopine uzorka injekcije azitromicina

Priprema otopine uzorka injekcije azitromicina ista je kao i kod određivanja bakterijskih endotoksina u injekcijama azitromicina kinetičkom turbidimetrijskom metodom (poglavlje 3.2.4.1.).

3.2.5.2. Postupak pripreme instrumenta i opreme za određivanje

Prijenosni spektrofotometar (slika 8) koristi LAL kinetičku kromogenu metodologiju za mjerenje intenziteta boje direktno povezane s koncentracijom endotoksina u uzorku (PLIVA, 2015).

Osnovni dijelovi ovog uređaja jesu:

- Prijenosni spektrofotometar, Kinetic Reader, proizvođač Charles River Endosafe
- Printer (DPU-414 Seiko Thermal Printer ili Epson TM-U220D Printer)
- Računalni program Endosafe PTS

U dodatnu opremu spadaju i ulošci koji imaju po 4 jažice (slika 9) od kojih svaka sadrži točno određenu količinu LAL reagensa, kromogenog supstrata i kontrolnog standarda endotoksina (CSE).

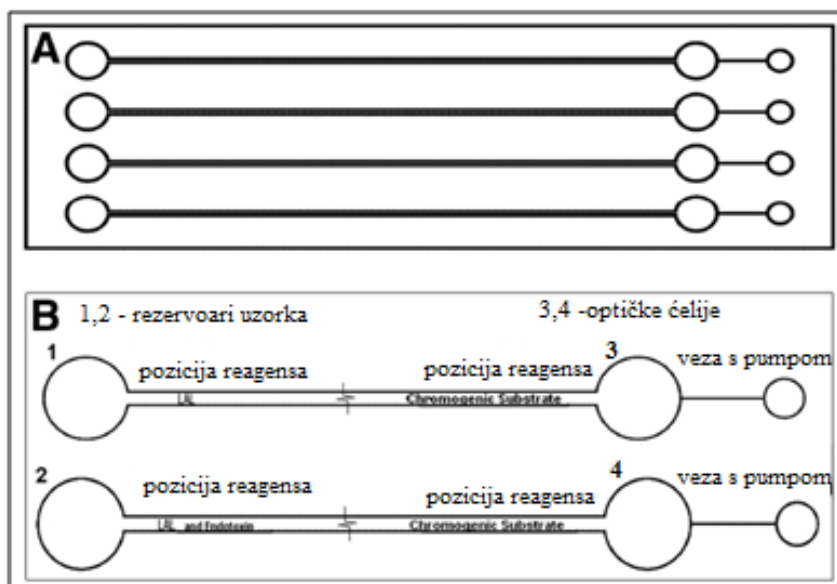


**Slika 8. Prijenosni spektrofotometar
(PLIVA, 2015)**



**Slika 9. Ulošci (cartridges) za PTS
(PLIVA, 2015)**

Nakon dodavanja 25 μ L uzorka u svaku jažicu (slika 10), čitač povlači uzorke putem kanala gdje se uzorci miješaju s LAL reagensom (u dvije jažice, 1. i 3.) te LAL reagensom i pozitivnom kontrolom (dvije jažice, 2. i 4.). Uzorak se inkubira te miješa sa kromogenim supstratom (sve 4 jažice).



Slika 10. Prikaz izgleda unutrašnjosti uloška s reagensima za PTS (PLIVA, 2015)

Nakon miješanja mjeri se optička gustoća jažica i analizira, tj. uspoređuje s arhiviranom standardnom krivuljom. Rezultati testa se izražavaju kvantitativno i dobivaju se za oko 15 minuta, ovisno o uzorku (PLIVA, 2015).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Detekcija bakterijskih endotoksina u uzorcima injekcija azitromicina provodila se dvjema metodama: kinetičkom turbidimetrijskom metodom i brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru. Prije analize uzorka injekcija azitromicina kinetičkom turbidimetrijskom metodom i brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru, provedena je validacija kinetičke turbidimetrijske metode. Validacijom se ispitalo izaziva li uzorak inhibiciju ili pojačanje u testu za određivanje bakterijskih endotoksina.

Prva primijenjena metoda je kinetička turbidimetrijska metoda. Kinetička turbidimetrijska metoda je u skladu s farmakopejskim zahtjevima (European Pharmacopoeia, 2017a). Ovom se metodom dobivaju rezultati u realnom vremenu te su nakon završetka testa vidljivi na ekranu spojenog računala. Osim toga, rezultati su objektivni, konkretni i kvantitativni. Metoda je takva da uspješno svladava interferencije. Za provođenje ove metode koristi se mikrotitarska pločica koja se umeće u spektrofotometar. Pločica sadržava 96 jažica pa se prema tome može napraviti i do 16 analiza istovremeno. Najniža granica detekcije u slučaju ove metode je $0,05 \text{ EU mL}^{-1}$ (Dawson, 1995).

Druga primijenjena metoda je kinetička kromogena metoda, odnosno brza metoda na prijenosnom spektrofotometru. Karakteristike ove metode jesu što se koriste ulošci s reagensima za prijenosni spektrofotometar licencirani od strane FDA - a te je metoda u skladu s farmakopejskim zahtjevima. Osim toga, s prijenosnim spektrofotometrom je lako rukovati i analize se mogu provoditi bilo gdje, u laboratoriju ili u pogonu. Rezultati provedene analize se snimaju u sami instrument i nakon analize prikazuju na ekranu instrumenta, ali se mogu i isprintati na pomoćnom printeru. Do 100 različitih rezultata se može pohraniti u program instrumenta. Vrijeme potrebno za obavljanje analize jednog uzorka je oko 15 minuta, a i samo baratanje s instrumentom je vrlo jednostavno. Granica detekcije na prijenosnom spektrofotometru je $0,05 \text{ EU mL}^{-1}$. Sve dosad navedene karakteristike su prednosti ove metode, međutim na prijenosnom spektrofotometru se može provesti analiza samo jednog uzorka u 15 minuta jer je uložak koji se koristi namijenjen za analizu samo jednog uzorka (Nagarajan i Chitnis, 2012).

Obje primijenjene metode koriste slične principe. Kinetička turbidimetrijska metoda radi na principu mjerenja optičke gustoće koja je u kvalitativnom odnosu s koncentracijom endotoksina, dok kinetička kromogena metoda mjeri intenzitet boje koji je proporcionalan koncentraciji endotoksina u uzorku. Obje se metode temelje na LAL testu. Kinetička turbidimetrijska i kinetička kromogena metoda su u skladu sa zahtjevima farmakopeje. Što se tiče opreme potrebne za provođenje ovih dviju metoda, oprema potrebna za provođenje kinetičke turbidimetrijske metode je skuplja od one za provođenje kinetičke kromogene metode, ali su zato reagensi skuplji u slučaju kinetičke kromogene metode (Sandle, 2016).

4.1. VALIDACIJA KINETIČKE TURBIDIMETRIJSKE METODE

U proizvodnji parenteralnih lijekova, farmaceutska industrija posebnu pažnju stavlja na kvalitetu istih, odnosno odsutstvo bakterijskih endotoksina u takvim pripravcima (Ogawa, 1994). Zbog zdravstvenih problema koje bakterijski endotoksini uzrokuju kod čovjeka, treba osigurati da u parenteralnim pripravcima nema bakterijskih endotoksina (Beeson, 1947). Prije analize uzoraka, kinetičkom turbidimetrijskom metodom i metodom na prijenosnom spektrofotometru, potrebno je validirati kinetičku turbidimetrijsku metodu. Validacijski testovi su provedeni na uzorcima injekcija azitromicina iz tri različite serije. Testovi uključuju provjeru standardne krivulje i test na interferirajuće faktore kako bi se odredilo pogodno razrijeđenje pri kojem se mogu provoditi testovi, a da ne dolazi do interferencije (Zink McCullough i Weidner – Loeven, 1992). Validacija uključuje provjeru standardne krivulje, odnosno priređivanje najmanje tri koncentracije, u ovom slučaju koncentracije 5, 0,5 i 0,05 EU mL⁻¹ te mjerenje srednjeg reakcijskog vremena (European Pharmacopoeia, 2017a). Rezultati provjere standardne krivulje prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Rezultati provjere standardne krivulje

Standardna krivulja (EU mL ⁻¹)	Seriya	Srednje reakcijsko vrijeme (s)	CV (%)
5	1	673,3	1,17
	2	582,0	1,25
	3	602,1	1,20
0,5	1	1058,5	0,97
	2	1006,7	0,77
	3	1019,6	0,99
0,05	1	1915,9	0,96
	2	1850,6	0,95
	3	1889,8	0,79
Negativna kontrola vode za LAL test	1	>1950,0	0,00
	2	>1890,0	0,00
	3	>1920,0	0,00
Jednadžba	1	Log (RT) – 0,2390 * Log (ÉU) + 2,9652	
	2	Log (RT) – 0,2512 * Log (ÉU) + 2,9361	
	3	Log (RT) – 0,2464 * Log (ÉU) + 2,9432	
R – vrijednost	1	-0,9990	
	2	-0,9995	
	3	-0,9990	

Na početku validacijskog testa, provjerena je standardna krivulja. Apsolutna vrijednost koeficijenta korelacije (r) iznosi redom -0,9990 za prvu seriju standarda, -0,9995 za drugu i 0,9990 za treću seriju standarda. Zahtjev za standardnu krivulju je da apsolutna vrijednost koeficijenta korelacije mora biti veća ili jednaka 0,980, što u ovom slučaju i jest pa je standardna krivulja valjana i može se dalje koristiti.

Nakon provjere standardne krivulje, provodi se preliminarni test kako bi se odredilo pri kojim razrijeđenjima dolazi do interferencije te pri kojim je razrijeđenjima ista prevladana (Soncin i sur., 2009). Da bi preliminarni test bio valjan, potrebno je mjeriti pH vrijednost mješavine uzorka i lizata te provjeriti koncentraciju endotoksina u otopini odnosno negativnu kontrolu. Iskorištenje endotoksina u pozitivnoj kontroli produkta (PPC iskorištenje) govori pri kojem razrijeđenju dolazi do interferencije (European Pharmacopoeia, 2017b). Rezultati preliminarnog testa prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Rezultati preliminarnog testa

Razrijeđenje	Koncentracija (mg mL ⁻¹)	pH mješavine uzorka i lizata	Seriya	Negativna kontrola-endotoksini u otopini (EU mg ⁻¹)	Iskorištenje endotoksina u PPC (<i>spike recovery</i>) (%)	CV (%)
1:1	95	6,5	1	<0,0005	N/A	0,00
			2	<0,0005	N/A	0,00
			3	<0,0005	N/A	0,00
1:2	47,5	7,5	1	<0,0011	N/A	0,00
			2	<0,0011	N/A	0,00
			3	<0,0011	N/A	0,00
1:10	9,5	7,0	1	<0,0053	50	0,84
			2	<0,0053	21	0,29
			3	<0,0053	49	0,51
1:20	4,75	7,0	1	<0,0105	81	1,48
			2	<0,0105	60	0,76
			3	<0,0105	80	0,41
1:40	2,375	7,0	1	<0,0211	94	1,21
			2	<0,0211	91	1,26
			3	<0,0211	94	0,68
1:80	1,1875	7,0	1	<0,0421	98	1,13
			2	<0,0421	98	0,94
			3	<0,0421	96	0,84
1:160	0,59375	7,0	1	<0,0842	98	0,90
			2	<0,0842	106	1,04
			3	<0,0842	101	1,38
1:320	0,296875	7,0	1	<0,1684	101	1,25
			2	<0,1684	108	1,16
			3	<0,1684	103	1,10
1:665	0,142857142	7,0	1	<0,3500	115	0,79
			2	<0,3500	122	1,01
			3	<0,3500	118	1,14

Preliminarni test proveden je nakon provjere standardne krivulje. Da bi preliminarni test bio valjan, pH vrijednost mješavine uzorka i lizata mora biti u rasponu od 6,5 – 8 što definira proizvođač lizata. pH vrijednost svih mješavina uzoraka i lizata je u tom rasponu. U uzorku iz serije 1, rezultati preliminarnog testa pokazali su da je inhibicija uzorka zabilježena pri koncentraciji od 95 mg mL⁻¹ (osnovnoj otopini) i u razrijeđenju 1:2, gdje je koncentracija uzorka injekcije azitromicina 47,5 mg mL⁻¹. Zaključak je donesen na temelju iskorištenja endotoksina u pozitivnoj kontroli koji je manji od 50%, a kriterij prihvatljivosti je 50 – 200%. U uzorku 1, pri koncentraciji od 9,5 mg mL⁻¹ došlo je do prevladavanja interferencije.

Iskorištenje endotoksina u pozitivnoj kontroli tog uzorka je 50%. Za uzorak iz serije 2, inhibicija je prevladana kod razrijeđenja 1:20 što odgovara koncentraciji uzorka od 4,75 mg mL⁻¹ kao i u slučaju uzorka iz serije 3. Provedeni test je valjan i sva iskorištenja pozitivne kontrole su nakon prevladavanja inhibicije u prihvatljivom rasponu od 50 – 200%.

Testom inhibicije i pojačanja potvrđuje se rezultat preliminarnog testa. Prije same potvrde i ispitivanja pri odabranom razrijeđenju, potrebno je ponovno provjeriti standardnu krivulju.

Za odabrano razrijeđenje prati se iskorištenje endotoksina u pozitivnoj kontroli produkta (European Pharmacopoeia, 2017b). Rezultati testa inhibicije i pojačanja prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati testa inhibicije i pojačanja

Standardna krivulja (EU mL ⁻¹)		Serija		Srednje reakcijsko vrijeme (s)	CV (%)	
5		1		599,2	1,52	
		2		591,0	1,51	
		3		580,1	1,51	
0,5		1		1009,6	1,29	
		2		1021,0	1,25	
		3		999,8	1,15	
0,05		1		1863,8	1,56	
		2		1867,1	1,33	
		3		1854,2	1,12	
Negativna kontrola vode za LAL test		1		>1920,0	0,00	
		2		>1920,0	0,00	
		3		>1890,0	0,00	
Jednadžba		1		$\text{Log (RT)} - 0,2464 * \text{Log (EU)} + 2,9432$		
		2		$\text{Log (RT)} - 0,2498 * \text{Log (EU)} + 2,9421$		
		3		$\text{Log (RT)} - 0,2523 * \text{Log (EU)} + 2,9345$		
R – vrijednost		1		-0,9989		
		2		-0,9996		
		3		-0,9993		
Razrijeđenje	Koncentracija (mg mL ⁻¹)	Serija	Negativna kontrola - endotoksini u otopini (EU mg ⁻¹)	Iskorištenje endotoksina u PPC (<i>spike recovery</i>) (%)	CV (%)	
1:320	0,296875	1		<0,1684	128	1,20
		2		<0,1684	131	1,05
		3		<0,1684	126	1,14

Nakon provedenog testa na interferirajuće faktore (preliminarnog testa i testa inhibicije i pojačanja), ustanovljeno je da su svi validirani parametri unutar kriterija prihvatljivosti za korišteno razrijeđenje uzorka (1:320) te se odabralo razrijeđenje 1:320 za daljnje obavljanje testova.

4.2. USPOREDBA REZULTATA DETEKCIJE BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINA KINETIČKOM TURBIDIMETRIJSKOM METODOM I BRZOM METODOM NA PRIJENOSNOM SPEKTROFOTOMETRU

Kinetička turbidimetrijska metoda je metoda koja se uglavnom koristi u laboratorijima za određivanje bakterijskih endotoksina, međutim upravo zato što je brzu metodu na prijenosnom spektrofotometru moguće koristiti i izvan laboratorija, potrebno ih je usporediti i dokazati da je brza metoda na prijenosnom spektrofotometru valjana metoda za određivanje bakterijskih endotoksina (Nagarajan i Chitnis, 2012). Kako bi se usporedile ove dvije metode provedena je analiza istih uzoraka injekcija azitromicina s obje metode. Rezultati za kinetičku turbidimetrijsku metodu i brzu metodu na prijenosnom spektrofotometru za uzorak injekcija azitromicina prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Rezultati za kinetičku turbidimetrijsku metodu i brzu metodu na prijenosnom spektrofotometru za uzorak injekcije azitromicina

Parametar	Kriterij prihvatljivosti	Seriya	Kinetička turbidimetrijska metoda (1:320)	PTS metoda (1:320)
Vrijednost uzorka (EU mg ⁻¹)	Manje od 0,35 EU mg ⁻¹ endotoksina	1	<0,17	<0,17
		2	<0,17	<0,17
		3	<0,17	<0,17
CV uzorka (%)	Manje od 10%	1	0,00	0,0
		2	0,00	0,0
		3	0,00	0,0
CV pozitivne kontrole (%)	Manje od 10%	1	1,64	7,5
		2	1,54	1,1
		3	1,44	3,5
Iskorištenje endotoksina u PPC (<i>spike recovery</i>) (%)	50-200%	1	118	97
		2	92	139
		3	105	115

Rezultati pokazuju da se kinetičkom turbidimetrijskom metodom i kinetičkom kromogenom metodom na prijenosnom spektrofotometru dobivaju rezultati unutar kriterija prihvatljivosti. Uzorak injekcije azitromicina je prije analize kinetičkom turbidimetrijskom metodom i brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru razrijeđen 320 puta jer je tako određeno validacijom. Rezultati koji su dobiveni, odnosno koncentracija bakterijskih endotoksina u sva tri uzorka iz sve tri analizirane serije je manja od $0,17 \text{ EU mg}^{-1}$, a zahtjev je da koncentracija mora biti manja od $0,35 \text{ EU mg}^{-1}$ endotoksina.

Zahtjev za koeficijent varijacije za reakcijska vremena (CV) za uzorke i za pozitivnu kontrolu uzorka iznosi manje od 10 %. Koeficijenti varijacije za reakcijska vremena (CV) za obje tehnike su 0 % zbog jednakih izmjerenih reakcijskih vremena koja ulaze u izračun prema statističkoj formuli za koeficijent varijacije. Koeficijenti varijacije za reakcijska vremena (CV) za kinetičku turbidimetrijsku metodu provedenih analiza dosljedno pokazuju niže vrijednosti u odnosu na metodu na prijenosnom spektrofotometru. CV se računa pomoću statističke formule na temelju izmjerenih reakcijskih vremena. Kako su reakcijska vremena kod kinetičke turbidimetrijske metode viša nego u slučaju brze metode na prijenosnom spektrofotometru, izračunati koeficijenti varijacije su očekivano viši kod metode na prijenosnom spektrofotometru jer test traje kraće (15 min) pa time i manja razlika između nižih vrijednosti reakcijskih vremena daje više CV vrijednosti. Povišene vrijednosti CV- a kod metode na prijenosnom spektrofotometru nisu indikator manje točnosti tehnike.

Farmakopejski zahtjev za iskorištenje (*spike recovery*) za sve kinetičke metode određivanja sadržaja bakterijskih endotoksina u uzorku je 50 – 200% od vrijednosti dodane u uzorak kao pozitivna kontrola. Zbog varijabilnosti koja prati svaki biološki test raspon je širok no uzimajući u obzir da se radi o supstancijama biološkog podrijetla, gore prikazani rezultati pokazuju primjereno iskorištenje koje ne prilazi gornjoj niti donjoj granici zahtjeva (European Pharmacopoeia, 2017a).

U rezultatima između kinetičke turbidimetrijske metode i brze metode na prijenosnom spektrofotometru postoje male razlike, međutim tome je tako zbog toga što su to biološki testovi, koji koriste reagense biološkog podrijetla te su upravo zbog toga male varijabilnosti moguće. Bez obzira na to, brza metoda na prijenosnom spektrofotometru je valjana koliko i kinetička turbidimetrijska metoda.

5. ZAKLJUČCI

Provedena je validacija kinetičke turbidimetrijske metode te usporedba kinetičke turbidimetrijske metode s brzom metodom na prijenosnom spektrofotometru kod određivanja bakterijskih endotoksina u injekcijama azitromicina.

1. Kinetička turbidimetrijska metode je validirana te je određeno razrijeđenje pri kojem se izvode testovi i ono iznosi 1:320.
2. Obje metode za određivanje bakterijskih endotoksina daju rezultate unutar kriterija prihvatljivosti koje propisuje farmakopeja.
3. Analiza na prijenosnom spektrofotometru kraće traje, međutim istovremeno se može analizirati samo jedan uzorak, dok se u slučaju kinetičke turbidimetrijske metode, može analizirati 16 uzoraka istovremeno.
4. Dokazano je da je brza metoda na prijenosnom spektrofotometru valjana te se može koristiti za određivanje bakterijskih endotoksina.

6. LITERATURA

- Anonymous 1 (2017) *Limulus polyphemus*, <<http://www.jaxshells.org/biggiex.htm>>. Pristupljeno 03. svibnja 2017.
- Arambašić, B. M. (2011) Ekstrakcija i određivanje sadržaja bakterijskih endotoksina u uljanim parenteralnim preparatima: Estradiol[®] (estradiol dipropionat), Lutestrol[®] (progesteron + estradiol benzoat) i Testosteron[®] (testosteron enantat) inj., <milanarambasic.com/wp-content/uploads/2011/11/RAD.doc>. Pristupljeno 27. travnja 2017.
- Beeson, P. B. (1947) Tolerance to bacterial pyrogens. *J. Exp. Med.* **86**, 29 – 38.
- BioTek (2017) Spektrofotometar za mikrotitarske ploče, <<https://www.biotek.com/products/detection-microplate-readers/elx808-absorbance-reader/>>. Pristupljeno 20. lipnja 2017.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados - Rosales, R., Casadevall, A. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 620 - 630.
- Dawson, M. E. (1995) A wealth of options – Choosing an LAL test method. *LAL Update.* **13**, 3.
- Doerrler, W. T. (2006) Lipid trafficking to the outer membrane of Gram - negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **60**, 1 - 11.
- Duraković, S. (1991) Prehrambena mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, str. 1 - 12.
- El - Magdy Salama, S., Mobarez, E. A. (2015) Depyrogenation methods. *Egypt. J. Chem. Environ. Health.* **1**, 540 - 551.
- European Pharmacopoeia 9.0 (2017a) Guidelines for using the test for bacterial endotoxin, Council of Europe, Strasbourg, str. 593 – 596.
- European Pharmacopoeia 9.2 (2017b) Bacterial Endotoxin, Council of Europe, Strasbourg, str. 204 - 208.
- Flaum, I. (1978) Contamination of pharmaceutical products. *J. Pharm. Sci.* **67**, 1 - 11.
- Groves, M. J. (1969) Parenteral products: the preparation and quality control of products for injection, Elsevier Science, London, str. 5 - 10.
- HRN ISO 8402:1996, Upravljanje kakvoćom i osiguravanje kakvoće.
- INSEE (2017) National Institute of Statistics and Economic Studies – Homepage, <<https://www.insee.fr/en/metadonnees/definition/c1366>>. Pristupljeno 21. lipnja 2017.

- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A. (2012) Medical Microbiology, 26. izdanje, McGraw Hill Lange Medical, New York, str. 24 - 188.
- Kaštelan – Macan, M. (2003) Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb.
- Lodowska, J., Wolny, D., Jaworska - Kik, M., Kurkiewicz, S, Dzierzewicz, Z., Weglarz, W. (2012) The chemical composition of endotoxin isolated from intestinal strain of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Sci. World J.* **2012**: 647352. doi: 10.1100/2012/647352.
- Murphy, K. P., Janeway, C. (2008) Immunobiology, 7. izdanje, Garland Science, New York.
- Nagarajan, K., Chitnis, P. K. (2012) Migrating from gel – clot to PTS. BET Newsletter, <http://www.criverindia.com/asset/pdf/BET_Newsletter_November_2012.pdf>.
- Pristupljeno 20. lipnja 2017.
- Ogawa, J. (1994) Application of a bacterial endotoxin test for parenteral drugs. *Eisei Shikenjo Hokoku.* **112**, 209 - 211.
- Pavlica, M. (2012) Mrežni udžbenik iz genetike [online] Genetika - Web udžbenik, <<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl12.html>>. Pristupljeno 27. travnja 2017.
- PLIVA d.o.o. (2013) Validacijski protokol za determinaciju bakterijskih endotoksina kinetičkom turbidimetrijskom metodom, str. 1 – 14.
- PLIVA d.o.o. (2014) Bakterijski Endotoksini - Kinetička turbidimetrijska metoda, Zagreb, str. 1-16.
- PLIVA d.o.o. (2015) Uputa za rad i održavanje prijenosnog spektrofotometra za brze analize na sadržaj bakterijskih endotoksina (PTS), Zagreb, str. 1 - 16.
- PLIVA d.o.o. (2016) Priprema apirogenog laboratorijskog suđa i pribora, Zagreb, str. 1-11.
- PLIVA (2017) PLIVA Hrvatska– Homepage, <<http://www.pliva.hr/>>. Pristupljeno 02. svibnja 2017.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Fasseb J.* **8**, 217-225.
- Ryan, J.A. (2008) Understanding and managing cell culture contamination, Corning life science, <www.level.com.tw/html/ezcatfiles/.../contamination-COR.pdf>. Pristupljeno 10. lipnja 2017.
- Sandle, T. (2016) Pharmaceutical Microbiology, Elsevier Ltd., Amsterdam, str. 131 - 141.
- Schleifer, K. H., Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407- 477.

- Shanbrom, E. (1982) Purification of plasma protein products. US Patent 4314997 A.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2** : a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- Silveira, M. B., Costa, F. M., Ferreira, S. Z. (2011) Effect of the dilution factor on 18FDG and NA18F samples for bacterial endotoxin test using PTS, International nuclear Atlantic Conference, Belo Horizonte, Brazil.
- Soncin, S., Lo Cicero, V., Astori, G., Soldati, G., Gola, M., Suerder, D., Moccetti, T. (2009) A practical approach for the validation of sterility, endotoxin and potency testing of bone marrow mononucleated cells used in cardiac regeneration in compliance with good manufacturing practice. *J. Transl. Med.* **7**, 78.
- Suzuki, Y., Suzuki, K., Shimamori, T., Tsuchiya, M., Niehaus, A., Lakritz, J. (2016) Evaluation of a portable test system for assessing endotoxin activity in raw milk. *J. Vet. Med. Sci.* **78**, 49 – 53.
- Šokota, A., Kalauz, S. (2008) Lijekovi – oblici i primjena, Naklada Slap, Zagreb.
- Todar, K. (2012) Kenneth Todar, Ph. D. – Home Page, <http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>. Pristupljeno 27. travnja 2017.
- Venkateswara Reddy, B., Rasmitha Reddy, B., Navaneetha, K., Sampath Kumar, V. (2013) A review on parenteral production technology. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **3**, 596 - 610.
- Vraneš, J. (2013) Patogeneza bakterijskih infekcija. U: *Medicinska mikrobiologija* (Kalenić, S., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 86 - 95.
- Wang, L., Wang, Q., Reeves, P. R. (2010) The variation of O antigens in gram - negative bacteria. *Subcell. Biochem.* **53**, 123 - 152.
- Wenqiong, S., Xianting, D. (2015) Methods of endotoxin detection. *J. Lab. Autom.* **20**, 354 – 364.
- Zink McCullough, K., Weidner – Loeven, C. (1992) Variability in the LAL test: Comparison of three methods for testing pharmaceutical products. *J. Parent. Sci. Techn.* **46**, 69 – 72.