**细菌内毒素/热原**

FDA 1985 年 3 月 20 日

介绍

最近，有关细菌内毒素测试、其意义和解释以及与 USP 兔子测试的比较的文献中有大量讨论。该主题之前已通过 1979 年 1 月 12 日第 32 号检查技术指南进行过简要讨论，主题为：热原，仍然是一种危险。

由于细菌内毒素检测的接受度和使用率不断提高，ITG No. 32 正在更新。

USP 现在认可两项测试 - 用兔子进行的热原测试和细菌内毒素测试，也称为鲎变形细胞裂解物 (LAL) 测试。此外，该机构还批准对许多药物和设备产品使用细菌内毒素测试。本次 ITG 将重点关注热原/内毒素检测的意义和解释。还将讨论去热原的来源和方法。在无菌药物和器械制造商检查期间审查系统时，应认识到兔热原测试的局限性。

历史

1980 年 1 月 18 日，《联邦公报》提出了使用鲎变形细胞裂解物试验 (LAL) 测定内毒素的指南。随后，指南草案经过修订并于1983年重新发布。USP XX，第5号增补，修订了细菌内毒素检测。然而，与 FDA 指南草案不同的是，没有包含重新测试条款。大多数制造商都处于验证其产品细菌内毒素测试的某个阶段。

USP 负责修订药典测试方法和/或产品专论的小组委员会在过去几年中对细菌内毒素测试和产品专论要求做出了一些重大改变。1984 年，美国药典 (USP) 为五种水产品指定了特定的细菌内毒素限量。注射用水、无菌注射水和无菌灌溉水的允许内毒素限量为 0.25 内毒素单位 (EU)/ml。（EU=内毒素活性的测量单位）。然而，注射用抑菌水和吸入用无菌水的细菌内毒素限量稍高，为 0.5 EU/ml（USP - 补充 4a - 1984）。该机构已经认识到细菌内毒素检测的优点，特别是在灵敏度、重现性、范围和简单性方面。此外，

一些经过测试的成品，虽然由于所施用的产品剂量低而未发现可采取行动，但可能表明其他系统（例如注射水系统）中存在热原问题。例如，氰钴胺注射液等特定产品的内毒素浓度可以为 10 EU/ml，并被视为合规。然而，人们可能会质疑制造商的注射水 (WFI) 系统，因为 WFI 系统的浓度应为 0.25 EU/ml。

文献中有大量关于内毒性与热原性的讨论。许多 FDA 调查人员和检查报告审查人员都没有意识到 USP 兔测试作为内毒素测试的局限性。例如，艾琳在《年度医学评论》中评论道：“对实验动物重复施用脂多糖（LPS）（与细菌内毒素同义的化学名称）会导致一些生物效应逐渐减弱，尤其是发烧.这种称为内毒素耐受性的现象的确切机制尚不清楚”。此外，一些研究表明，军团杆菌的内毒素与更常见的革兰氏阴性生物体相比具有不同的毒性谱。特别是，军团内毒素的热原性不是很高（通过兔子测试），但在 LAL 中非常活跃 - 两次测试之间的差异为 1,000 倍。在这种情况下，兔子测试不足以确定存在的毒素的效力。

除了内毒素耐受性和对退伍军人内毒素的低反应性之外，USP 热原测试还有其他局限性。其中之一是与相同的标准化内毒素制剂相比，其测试结果存在差异。这种情况受到季节变化、实验室间因素、兔子物种特征以及其他生物学影响的影响。该测试不适用于某些类别的药物，包括放射性药物、癌症化疗药物、安眠药和麻醉药、维生素、类固醇和某些抗生素。已经发现，产品中明显的热原可以被治疗药物成分的物理化学活性“掩盖”。此外，兔试验对于鞘内药物产品中的内毒素检测不够敏感。

人们对内毒素的临床意义也知之甚少。这可能是因为革兰氏阴性菌最受重视的致病作用是产生发烧，而在内毒素的所有影响中，发烧可能是生物学和临床上最不重要的。

尽管许多制造商正在使用鲎试剂，但仍有一些制造商不愿意使用鲎试剂，因为它太敏感。

除了测试的灵敏度之外，还可以使用 LAL 测试更多的剂量单位/设备。例如，从合并的样品中发现无菌关键设备的内毒素水平处于可接受的水平。（注：USP 热原测试是在混合样品上进行的。）但是，当单独测试 LAL 单位的提取物时，偶尔会出现失败。注射用抑菌水样品也出现类似情况。多个单位的合并样品被发现内毒素水平低于 0.5 EU/ml。然而，一些特定剂量单位被发现超过了 0.5 EU/ml USP 限值，因此采取了监管行动。

细菌内毒素的特点

与“革兰氏阴性细菌内毒素”相反的“微生物热原”已成为许多不同物质的通用描述术语。然而，一些革兰氏阳性菌、分枝杆菌、真菌以及病毒可以产生热原物质，但革兰氏阴性菌产生的热原，即内毒素，对制药工业具有重要意义。

革兰氏阴性细菌外膜中发现的细菌内毒素是一类称为脂多糖 (LPS) 的磷脂的成员。LPS 不是革兰氏阴性菌的外源产物。细菌在细胞死亡和裂解后释放脂多糖。产生热原的革兰氏阴性细菌的好例子是大肠杆菌、变形杆菌、假单胞菌、肠杆菌和克雷伯氏菌。

用于计算单个药品内毒素限量的公式

内毒素的作用与给予患者的产品剂量中内毒素的量有关。由于不同产品的剂量不同，内毒素限量以K/M表示。K 为 5.0 EU/千克 (kg.)，代表人类和兔子的近似阈值热原剂量。这是判定产品热原性或非热原性的水平。M代表兔子热原测试剂量或在一小时内施用的每公斤最大人体剂量，以较大者为准。如果产品标记为鞘内注射，则 K 为 0.2 EU/kg。然而，有 5 种水产品（之前讨论过），由于可施用的体积较大且没有剂量限制，因此每毫升具有特定的内毒素限量。

实施例1-最大人体剂量为10ml/kg的非鞘内药物产品。

内毒素限量 = K 5 EU/kg - = ------- = 0.5 EU/ml M 10 ml/kg

实施例2-产品：氰钴胺注射液。效力：1000 微克/毫升

最大剂量/kg 14.3 mcg/kg（参见产品标签）

内毒素耐受限值 = 5.0 EU/kg - 非鞘内药物

内毒素限量 = K 5.0 EU/kg - = --------- = 0.35 EU/mcg M 14.3 mcg/kg

该值（0.35 EU/mcg）以每 mcg 产品的内毒素单位表示。为了将该值转换为每毫升内毒素单位浓度，请将其 (0.35 EU/mcg) 乘以产品效力（见下文）。

1000 微克/毫升 x 0.35 EU/微克 = 350 EU/毫升

这一测定值意味着，如果注射用药物生产商采用鲎试剂法对氰钴胺注射液进行内毒素检测，则该产品的含量不得超过350 EU/ml。

LAL 方法 - 一些固有的弱点

FDA 和 USP 已经认识到使用 LAL 进行内毒素检测的各种方法的有效性。有四种基本的市售方法，目前已获得 FDA 批准用于最终产品放行测试：(i) 凝胶凝块；(ii) 比浊法（分光光度法）；(iii) 比色法（Lowry 蛋白）；(iv) 显色测定。这些方法中使用的 LAL 试剂必须从 FDA 许可的制造商处获得，并且必须专门针对所选方法进行设计。文献中出现的许多其他鲎试剂方法都是凝胶凝块或比浊测试的改进，其中一些方法被设计为使用比基本方法更少的鲎试剂。

已知某些产品会干扰鲎试剂与内毒素反应的能力。这些因素可能是化学的或物理的。化学抑制剂会导致 LAL 反应（即 EDTA）、蛋白质变性（即荧光素）或 pH 值破坏（即 pH 值超出 6.0 - 7.5 范围）所需的二价阳离子螯合。物理抑制剂包括内毒素的吸附或产品粘度。尽管抑制程度可能有所不同，但大多数都会影响所有方法。然而，大部分抑制作用可以通过稀释产品来克服。其他因素，例如凝胶凝块测试中使用的玻璃器皿的形状和类型，也会影响测试的有效性。例如，硅化玻璃器皿以及塑料可以抑制凝胶凝块的形成或妨碍反应混合物终点的准确分光光度读数。

比浊法和显色法不能用于某些浑浊或有色的产品。此外，沉淀物的形成虽然具有抑制性，但在这些方法中可能会被误认为是阳性反应。与使用显色方法相关的一个问题是在添加酸以停止显色后形成沉淀。需要中性或碱性 pH 值才能溶解的产品最有可能导致此问题。

验证每种测试产品的鲎试剂方法的可靠性和准确性的必要性怎么强调也不为过。制造商可以通过用低水平的内毒素接种产品并对其回收率进行测定来证明这一点。使用的内毒素浓度应在裂解物敏感性的较低范围内。此外，一些研究人员发现，即使是裂解液试剂来源（即裂解液制造商）的选择也会导致测试结果的变化。因此，如果试剂来源发生任何变化，则必须重新验证测试。

自 1980 年首次发布以来，细菌内毒素检测中概述的分析程序已进行了多次修订。这些变化使 LAL 方法作为药典裁判检测更加可靠。显着的变化是 (i) 通过一组平行溶液（其中一个含有水，另一个含有 pH 值调整后的产品）稀释内毒素后，两组之间的反应混合物的终点差异不应大于两倍; (ii) 如果产品影响裂解物测试混合物，则可以使用抑制终点和 MVD 之间的任何稀释度；(iii) 用于测试的产品可稀释的最大量应使用最大有效稀释度 (MVD) 公式确定。该配方基于产品剂量、内毒素耐受限度和裂解物敏感性。超出此确定因素的产品稀释将使阴性结果变得毫无意义。有害的内毒素浓度可能会被稀释到裂解液的可检测范围以下；(iv) 从医疗器械产品中清洗细菌内毒素的程序模糊。提到了要小心注意不要使用过多的体积进行产品漂洗。

来源

胃肠外和医疗器械产品中的热原可能有多种来源。通常的来源是：用作溶剂或加工过程中的水；包装组件；用于制备产品的化学品、原材料或设备。良好做法包括控制上述潜在污染源的微生物和内毒素水平。

对于注射剂产品，检查表明，剂型中发现热原问题，且来源为原料之一时，则为活性原料药。对于在合成过程的某个后期阶段使用工艺水的原料药来说尤其如此。当工艺用水的微生物水平降低并且工艺用水系统受到控制时，药物的内毒素水平随后降低。

另外，如果药物是生物生产的，则纯化过程中微生物去除不完全可能导致药物具有高内毒素水平。例子包括通过发酵生产的抗生素或用于生产基因工程药物产品的革兰氏阴性细菌的副产品。正在评估酵母在该领域的潜在用途，以消除这个问题。

注射用产品的物理部件（例如塞子和小瓶）的一般处理程序规定在灭菌之前用无热原水清洗这些部件。良好的做法包括在清洗后尽量减少对部件的处理，并及时灭菌，特别是在蒸汽灭菌的情况下。储存未经消毒的湿塞可能会导致微生物增加，并可能导致内毒素水平增加。

内毒素的另一个来源是注射用水 (WFI) 或无热原水系统。一般而言，循环热水系统（高于 75°C）提供的环境最不利于微生物生长和内毒素形成。注射系统的循环水在较低温度（约 60°C）下在一定程度上（轻微）受系统温度控制。有人担心，可能存在一些致病性革兰氏阴性生物，例如嗜肺军团菌，它们会在 57°C 下生存和生长。有大量关于医院热水系统中存在嗜肺军团菌的信息。文献表明，定期将这些热水系统的温度提高到 75 - 80°C 可以消除该微生物。

一般来说，环境温度注射用水系统存在最大的问题。许多令人反感的微生物是内毒素的良好来源，它们在冷注射用水系统中生长良好。对于反渗透 (RO) 系统尤其如此。人们已经认识到，由于反渗透过滤器不是绝对的，因此可能需要将它们串联起来才能制造无热原注射用水。

如前所述，某些类型微生物的生长会导致内毒素水平增加。非无菌批量加工或配制溶液，特别是不含防腐剂的溶液，是微生物生长的良好环境。制造商对这些解决方案进行内毒素检测并不常见。大多数都会在对溶液进行灭菌过程之前进行微生物测试，以确定微生物水平（生物负荷）。然而，为了确定高内毒素水平的可能性，建议在执行任何灭菌步骤之前进行微生物测试。例如，如果产品在最终灭菌之前配制并过滤，过滤后生物负荷的微生物测试将为确定灭菌过程的充分性提供一些有用的信息。然而，它几乎无法提供有关最大限度减少内毒素污染的工艺充分性的信息。由于内毒素是由高水平的微生物产生的，并且不能通过灭菌或微生物过滤器去除，因此随后高微生物水平的降低不会与高内毒素水平的类似降低相关。

与肠胃外药物产品一样，无菌设备有时被证明受到内毒素污染。来源是水，它以某种方式进入制造过程。例如，用于制造过滤器的过滤介质等组件的清洗，或者在随后的灭菌之前清洗/漂洗管道或其他塑料装置是内毒素的潜在来源。

去热原

产品中一旦存在内毒素就很难去除。保持成品和组件相对不含内毒素比一旦存在就必须将其去除要好得多。

物理成分最常见的去热原程序包括焚烧和通过清洗去除（也称为稀释）。文献表明，过滤、辐射和环氧乙烷处理等其他程序在降低热原/内毒素水平方面效果有限。对于注射用水系统，两种可接受的制造方法是蒸馏和反渗透。

蒸馏已被证明是从受污染的水样中去除内毒素的有效且最可靠的方法。已发现与蒸馏器中的飞溅和随后的馏出物污染相关的孤立问题。类似地，已知冷凝器或热交换器也会出现孤立的问题。请参阅 ITG 编号。2079 年 7 月 31 日的 34 日，对热交换器进行了额外讨论。

与大多数流程和设备一样，了解设备的局限性和/或功能是一个很好的做法。例如，偶尔会发现，给水中内毒素含量较高的蒸馏器产生的注射用水质量不可接受（>.25 EU/ml）。更重要的是，当通过反渗透 (RO) 生产注射用水时，应了解给水的内毒素水平。由于 RO 过滤器不是绝对的，因此可能需要将它们串联起来才能制造无热原注射用水。无论采用哪种系统，良好的实践都包括隔离和评估 WFI 系统中每台设备的能力。有关反渗透的讨论，请参阅 2080 年 10 月 21 日的 ITG 第 36 号。

对于物理部件，例如塞子和管道，最常见的是用无热原水系统冲洗或稀释。一些制造商，例如 LVP 制造商，采用稀释方法去除玻璃容器中的内毒素，然后通过其他方式进行灭菌。与无菌验证一样，内毒素减少验证应包括了解内毒素负荷和令人满意的内毒素挑战。需要指出的是，由于USP热原试验对兔子的敏感性不足，因此应采用鲎变形细胞裂解物试验进行“挑战”试验。尽管该领域没有指南，但预计当采用稀释过程时，内毒素挑战至少会减少 3 个对数。

历史上，小瓶或玻璃组件通过高温干热灭菌而变得无热原。一些文献建议通过在 250°C 的温度下加热 45 分钟来对玻璃器皿和设备进行去热原。据报道，650℃ 1 分钟或 180℃ 4 小时同样可以破坏热原。Tsuji 等人于 1978 年发表的研究表明，在较低温度（170°C）下，热破坏遵循二阶速率，并且在较低温度下内毒素水平降低 3 个对数可能不切实际。

还有其他不太常见的方法用于去除内毒素。在无菌粉末的制造中，通常采用结晶或纯化来去除内毒素。一些制造商有时会采取不太可接受的方法，例如用溶剂清洗或冲洗晶体或粉末，以去除内毒素。

注意：对于不被注射的物理组件（例如塞子或小瓶），使用稀释或冲洗是可以接受的。然而，当将其用作化学成分时，其价值有限。只能保证粉末外表面的内毒素水平降低，而不是整个晶体的内毒素水平降低。

其他不太普遍接受的方法包括环氧乙烷处理和辐射。研究表明，暴露于环氧乙烷后，透析器中大肠杆菌内毒素的热原性降低了约 80%。

对于制造设备和传输线，稀释去热原通常是首选方法。有时使用强碱或氧化溶液来减少这些储存/输送系统中的热原。然而，随后应该用注射用水冲洗。冲洗溶液中的残留量可以达到低于百万分之一 (ppm)，并已被接受。

