

Translation of a Chosen Technical Text and Analysis of the Methods Used During the Translation Process

Kateřina Šimková

Bachelor Thesis
2009



Tomas Bata University in Zlín
Faculty of Humanities

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta humanitních studií
Ústav anglistiky a amerikanistiky
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina ŠIMKOVÁ**
Studijní program: **B 7310 Filologie**
Studijní obor: **Anglický jazyk pro manažerskou praxi**

Téma práce: **Překlad vybraného technického textu a analýza
metod použitých během překladu**

Zásady pro vypracování:

Charakteristika a specifické rysy odborného technického textu
Překlad části vybraného odborného textu: Validation Procedures for the Bacterial Endotoxins Test
Analýza překladatelských postupů a prostředků užitých při překladu
Slovníček použitých odborných výrazů

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Cooper, James F., and Cheryl Moses. *Validation Procedures for the Bacterial Endotoxins Test*. USA: Davis Healthcare International Publishing, LLC, 2005.

Knittlová, Dagmar. *K teorii i praxi překladu*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2003.

Bassnett, Susan. *Translation studies*. London: Routledge, 2004.

Baker, Mona. *In other words*. London: Routledge, 1992.

Anglicko-český chemický slovník. Praha: SNTL – Státní nakladatelství technické literatury, 1988.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Vlasta Vaculíková

Ústav anglistiky a amerikanistiky

Datum zadání bakalářské práce:

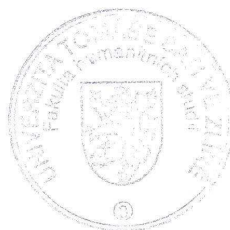
30. listopadu 2008

Termín odevzdání bakalářské práce:

15. května 2009

Ve Zlíně dne 12. února 2009

prof. PhDr. Vlastimil Švec, CSc.
děkan



L.S.

doc. Ing. Anežka Lengálová, Ph.D.
vedoucí katedry

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k prezenčnímu nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci - nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům.

Ve Zlíně 15.5.2009

Kateřina Gialková

1) Zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47b Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

2) zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

3) zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst.

3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato Bakalářská práce je rozdělena na dvě části. První část je teoretická a definuje rámec celé práce, do kterého patří popis technického a dále chemického a farmakologického textu a jejich charakteristické znaky. Následuje charakteristika teoretických problémů překladu technických textů. Druhá část se skládá z vlastního překladu farmakologického textu *Validační postupy pro test na bakteriální endotoxiny*, s následnou analýzou překladatelského postupu založenou na teoretické části práce. Pro lepší porozumění původního textu je přiložen slovníček použitých pojmů.

Klíčová slova:

Analýza, technický text, odborný funkční styl, terminologie

ABSTRACT

This Bachelor Thesis is divided into two parts. The first one is theoretical and defines the scope of the whole thesis, which is to describe technical and subsequently also chemical and pharmacological texts and their characteristic features. This is followed by the characterization of theoretical problems of translating of technical writings. The second part consists of the translation of a pharmacological text *Validation Procedures for the Bacterial Endotoxins Test*, consequently followed by an analysis of the translation process based on the previous theoretical part. The lexicon of special terminology is enclosed to help the reader to understand the original text.

Keywords:

Analysis, technical text, technical functional style, terminology

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to take this opportunity to thank to my great family, because without their help and support I would not be able to study at the University. And especially I would like to thank to my supervisor, Mgr Vlasta Vaculíková, for her advices and unflagging patience.

DECLARATION OF ORIGINALITY

I hereby declare that the work presented in this thesis is my own and certify that any secondary material used has been acknowledged in the text and listed in the bibliography.

May 15, 2009

Kalevna Ginkord
.....

CONTENTS

INTRODUCTION	11
I THEORY	12
1 CHARACTERISTICS OF TECHNICAL TEXT	13
1.1 Definition of Technical Text	13
1.2 Specifics of Technical Style	13
1.2.1 Lexical Features of Technical Texts	14
1.2.2 Impersonality of Technical Texts	15
1.2.3 Syntax	16
1.3 Specifics of a Chemical Text	17
1.3.1 Information Sources in Chemistry	18
1.4 Special Features of Pharmacology	18
2 TRANSLATION OF TECHNICAL TEXT	19
2.1 Stereotypes in Translating of Technical texts	19
2.1.1 Terminology	19
2.1.2 Lack of Style	20
2.1.3 Translator = Specialist	20
II ANALYSIS	22
3 VALIDAČNÍ POSTUPY PRO TEST NA BAKTERIÁLNÍ ENDOTOXINY	23
3.1 Úvod	23
3.2 Validace testů na bakteriální endotoxiny pro léčiva a zařízení	23
3.2.1 Harmonizovaný test bakteriálních endotoxinů (HBET)	24
3.2.2 Validace metod BET pro nové chemické sloučeniny (NCE)	27
3.2.3 Kompatibilní profil stanovený LAL metodami kinetickou a gelové sraženiny	30
3.3 Validace postupů depyrogenace pomocí metod BET	35
3.3.1 Metody depyrogenace	36
3.3.2 Validace systému vody na injekce (WFI)	37
4 ANALYSIS OF THE TRANSLATION PROCESS	39
4.1 Analysis of the Source Text	39
4.1.1 Background of a Source Text	39
4.1.2 The purpose and Form of the Text	39
4.2 Translation Analysis	40
4.2.1 Infinitive, Gerund and Participle Structures	40

4.2.2 Expletive IT + THERE.....	41
4.2.3 Passive Voice.....	41
4.2.4 Lexical Means and Terminology.....	42
4.2.5 Noun Groups.....	43
CONCLUSION	46
BIBLIOGRAPHY	47
APPENDICES	48

INTRODUCTION

This Bachelor Thesis combine a theoretical knowledge of the syntactic, semantic and lexical features of the technical text and an ability to translate such a text and then to analyze those features practically.

The topic of the given text is a validation of a Bacterial Endotoxin Test (BET), which is very specialized field designated only to the professional audience. Person without an appropriate level of technical education probably would not be able to understand the text properly, but on the other hand, for professionals it is very well-readable paper. The text is written in more journalistic way than it is usual with similar topics. It is not a technical report, but the confrontation of two methods of bacterial endotoxin testing written in the way similar to the style of scientific journals.

Translation process of such a text is quite specific and it should be made by an experienced translator with at least good knowledge of the topic.

On the following pages, some theoretical aspects of translating of technical texts are given, followed by the translation of the text concerning the BET validation and by an analysis of the translation process.

I. THEORY

1 CHARACTERISTICS OF TECHNICAL TEXT

Technical literature surrounds people in their daily life, starting with the patient information leaflet enclosed to the medicine and finishing with the list of ingredients described on yogurt pots. Principally, technical texts are designated to spread information about advances in technology and science among experts and specialist, but consequently they are widened among non-professionals as well.

1.1 Definition of Technical Text

Firstly, there should be defined technical text. Its major aim is to inform about results of researches, to explain specialized issues and to describe the processes used during the research. The technical style is the sub-style of factual functional style and it is further divided into administrative and educational (scientific) sub-styles. The educational one was called “professional” in the past, but the scope of technical style is extending also into the literature which is not primarily intended for specialists and this literature educates also non-professionals. Of course, the vocabulary and structure of the text must be adapted to different audience as well. This educational functional style is further developed into two subdivisions – the first one describes the literature designated for professionals and the second one details popular-scientific literature for general public.¹

In popular-scientific style some features of colloquial style are included as well, for public it signifies lower concentration of professional terms in the text. This style tries to familiarize public with complicated matters; it describes their specific features and characteristics by usage of richer vocabulary and shorter, more intelligible sentences. The terminology is not very technical and when some term appears, it is explained and depicted in the text. Popular style informs public about scientific researches, and that is the reason why it is an indispensable part of functional styles.²

1.2 Specifics of Technical Style

The principal function of a technical style is to convey the idea exactly, fully and concisely. It is fulfilled mainly by consistent usage of specific terminology and a polished sentence structure, just because the technical style is represented primarily in written form of

¹ See Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada*, 136.

² See Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada*, 138.

monologue, without any feedback from audience and empty of situation context. Lectures and conferences are only the minor form of representation of technical information and that is why the intonation, gestures or facial expressions usually can't support the message.³ This organization is logical, technical information conveys a large amount of technical terms and descriptions of processes and it would be very confusing and inexact to spread it exclusively or predominantly verbally. Because of the scientific concepts or technical terminology included in the texts, technical style must be very distinctive, clear and coherent. The word order, sentence structure and composition of the text are usually very stereotyped and it makes the text unequivocal and precise.

Characteristic features of technical texts are specialized terminology, stereotyped sentence structure divided into theme and rheme and an objectivity of the information.

1.2.1 Lexical Features of Technical Texts

The most significant lexical feature of scientific text is a usage of nouns. Scientific style is conceptual; it means that typical parts of speech used in technical text are technical terms - nouns or appropriately adjectives. To make the text unambiguous and clear, selection of the words should be carefully made, subjective terms are not appropriate.

Compound words are the most characteristic lexical units in technical texts. Compounding means, that two or more individual units work together as one lexical unit, frequently with meaning of noun or adjective.⁴ According to the *Comprehensive Grammar of the English Language*, those lexical units can appear in a form of unchanged bases, or the first element can be arranged into a special form which allows easy connecting with another unit; or the last element can be modified to influence the form of compound by usage of suffixes.

English language has ability to construct almost unlimited number of noun groups for naming of individual things, in contrast to Czech where the structure must be developed with help of subordinate clauses very often.⁵

³ See Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada*, 137.

⁴ See Quirk et al., *Comprehensive grammar of the english language*, 1567.

⁵ See Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada*, 148.

Physics or mathematics are examples of the most specialized disciplines, where the lexical possibilities are the most restricted. Terms are distinctive, often repeated and the vocabulary is very stereotyped, however it is helpful when reading technical texts, because of their exactness. The primary reader is an expert, who needs only relevant information about materials, tools or methods used during the process. Anything else is unnecessary and an attempt to vary the terminology or a style of writing could cause a vagueness of the text.

With technical language, the suppression of emotive and expressive meaning is connected as well. The aim of technical style is to express information unambiguously, and every expression of author's emotion is undesirable. It is reflected in a rare use of expressive words or even interjections. The terms are usually clear in their meaning, with a limited scope of usage; but also some expressions slightly emotive can be found, such as *conductor alive* in electrical engineering.⁶

Technical nomenclature developed into many specific areas with their own specialized terminology in such a way, that it became impossible to understand all the vocabulary used even within one branch. For example physics is an exact science developed in many sub-branches, such as nuclear physics or astrophysics. It can be expected that the nuclear physicist wouldn't know specialized vocabulary of astrophysics, in spite of the fact that the fundamental terminology is the same, or it is derived from the same basic elements.

1.2.2 Impersonality of Technical Texts

Impersonality is a feature typical for scientific texts, but from this point of view, the difference between exact sciences and humanities should be noticed. Despite of the fact that the main aim of technical style is to define the things exactly and to transmit information clearly, the style of humanities is in fact more similar to the journalistic style. Its terminology is not so specific, it is more complex. The impersonal style of writing, typical for exact sciences, doesn't appear in humanities in larger degree.⁷

⁶ Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada* (Olomouc, Univerzita Palackého 2003), 152.

⁷ See Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada*, 138.

A disparity between humanities and exact sciences is clearly visible in utilization of *passive voice*, which is used to express impartiality and objectivity. The usage of passive voice in the documents of humanities is quite poor in contrast to the exact sciences. The main quality of this feature is that it doesn't have to specify the doer of the action when it is irrelevant or unnecessary, but in case the agent should be known, it can be voiced at the end of the sentence after a preposition "by".

Example: The EL for a new entity is determined by this dose-related formula:

The passive structure's function in the text is not only to express the objectiveness of the writer, but it also makes the text more coherent. It would not be sufficient to read the text written only in passive voice, because it wouldn't be comprehensible. Passive structure is an element which makes the text more professional, but also more demanding of understanding in case it is used very frequently.⁸

This is caused by the fact that active structure is more natural to the reader and another thing is that passive voice requires more lexical units to express the same idea. However, there are not any strict instructions for use of passive or active voice, however, when the author is unimportant to be acknowledged, it is efficient to use passive.

Another method of expressing idea without exact determination of the doer is to use *universal subject* "we". It specifies the doer more than usage of passive voice, but still it is relatively general title used also in Czech language. In the past, impersonal pronoun *one* was used in the same meaning, but it became undesirable in technical writing because of its interchangeability with cardinal numeral *one*.⁹

In scientific texts, also the structures with an empty subject are very popular. This *expletive it* or *there* fulfils the syntactic criteria of a formal subject, but with no semantic function.

1.2.3 Syntax

Sentences in scientific texts have always the same inner structure. An English sentence is divided into two parts – *theme* and *rheme*. Theme keeps "old" information known from the previous context, whereas rheme carries "new", important and so far unknown message.

⁸ See James M. Haile, *Technical Style*, 59.

⁹ See James M. Haile, *Technical Style*, 35.

For English scientific style it is typical to locate rheme at the absolute end of the sentence, beyond all the adverbials or condition descriptions.¹⁰

In case of passive structures, the author or doer positioned at the end of the sentence is new important information added to the well-known fact. This organized structure helps the reader to concentrate more on the message carried by the sentence than on the sentence itself.

Very important are linking expressions and connectors referring to previous sentence, such as *however, furthermore, so* or *in addition*. They provide the logical connecting link between sentences to make them more comprehensible to the reader.¹¹

Inconsiderable feature of technical writings is the usage of *gerunds, participles* and *to-infinitive* structures, which represent the ability of English language to create compact structures explicitly expressing the heart of matter. It is very common especially in the texts of exact sciences.

1.3 Specifics of a Chemical Text

Chemistry is an exact science and its literature is a typical representative of technical functional style. Furthermore, it depends on the form of the text, whether it is written for specialists, or for public with intention of education.

Chemical literature shares common features of technical style, such as repeated terminology and stereotyped sentence structure; however it also includes some unique characteristics.

The most specific features of chemical texts are chemical formulae, describing chemical structure of substances. This *molecular information*¹² is an international communication factor among chemists all over the world. However, because of the need of further developed communication means and information transfer, the nomenclature of terms derived from the titles of chemical elements was generated. The system of prefixes and suffixes based on the number of atoms helps to distinguish individual substances at the first sight.

¹⁰ See Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada*, 144.

¹¹ See M. Fogiel, *REA's handbook of English grammar, style and writing*, 166.

¹² National Research Council, *Chemical Structure Information Handling* (Washington: National Academy of Sciences, 1969), 1.

1.3.1 Information Sources in Chemistry

The most important source of chemical information is the Chemical Abstract Service which is the division of American Chemical Society. According to its websites <http://cas.org>, CAS provides the most comprehensive databases of disclosed research in chemistry and related sciences, including the world's largest collection of substance information, the CAS REGISTRYSM.

Alternative essential sources are scientific journals publishing expert articles and reviews originated by specialists. Majority of those technical journals has an online version, but access to the articles might be paid. In such a case, every article has its own visible abstract including the most significant information contained in the text, and according to this, a reader can decide, whether to download it or not.

1.4 Special Features of Pharmacology

Pharmacology is a scientific branch dealing with development and administration of medications, and then it is obvious that the major pharmacologic features appearing in the texts are the names of the drugs and diseases, consequently the description of medication development process, its application and effects. A characterization of medication substances and the terms referring to the human body and its organism are included. From another point of view, an issue typical for pharmacology is characterization of laboratories as well as tools and devices.

The internationality of a world of science leads to the fact that the majority of the terms used in pharmacological texts has an English equivalent used all over the world, however, there are some exceptions where only Latin term is applied, for example LAL substance. Its name is not translated into English and in order to make its usage in the texts easier, only its acronym is used instead of *Limulus Amebocyte Lysate* designation.

The usage of Latin words in pharmacology is not unusual because of the fact that it is a branch of science derived from medicine and there is a strong linkage among these two fields.

2 TRANSLATION OF TECHNICAL TEXT

The major aim of translation of a technical text is to transmit the information from source language to the target language with an exact preservation of the meaning, but in style corresponding with the type of the text in target language. That is the principal mission of the translation process, to create the text which semantically exactly corresponds with the source one, but in form indistinguishable from the same text written originally in the target language.

The most significant role in this process is the role of a translator, who should be qualified or experienced enough to distinguish stylistic requests of individual languages and differences between them.

One of the things which differentiate the translation of technical text from other types of translation is specialized vocabulary. Usually, the most demanding process is not to determine the right equivalent in the target language, but to use that lexical unit properly, in the correct form and context.

2.1 Stereotypes in Translating of Technical texts

There are many stereotyped facts about translations of technical texts. Following paragraphs treat some of these misconceptions, which are further described in Jody Byrne's Technical Translation, and try to explain the real aims of the translating of technical texts.

2.1.1 Terminology

Although many people understand technical texts as a structure completely based on special vocabulary, it is not the major thing which a technical text deals with. During the translation process, this specific vocabulary creates only small part of the process, because usually it is not extremely difficult to seek the equivalent of given term in the target language, except some cases with real lack of equivalence on the word level. For a translator, it is much more essential to understand the style and flow of the text in the target language, than to have off all the vocabulary. The problem is not the terminology, but the fact, that the text in target language should be indistinguishable from the text on the same topic written in target language by a specialist. The credibility of the text is falling, when the style doesn't correspond with usual standard of target language, and this is not

connected only with correctly translated terms, but with their right usage in their correct form depending on the context.¹³

2.1.2 Lack of Style

Does the technical text have a style? There is a persisting attitude, that a technical text doesn't have anything like this, but it was mentioned in the previous paragraph, that the preservation of style of target language is fundamental to the reliability of the text. Definitely, there is a style in technical documents. It differs from the style of poetry, but it exists. On the example of the user's manual can be seen the text written with the lack of space, its usability depends on the way how it is constructed, which vocabulary was chosen to make the text clear and understandable to the reader – the layperson. The purpose of this document is to be transparent, with no other meaning but the one, in contrast to the poetry, where author leaves some space for reader's own imagination as well. Technical style is generally the style dealing with a lack of space and lack of synonyms, the possibility of using of developed language is limited and the translation process of technical texts doesn't allow the translator to develop his literary skills as much as some humanities, but to make the technical text comprehensible and flowing is more challenging than to have an unlimited possibilities.¹⁴

2.1.3 Translator = Specialist

A lot of things are much easier in case the translator is simultaneously an expert in the field detailed in the text. But definitely it isn't necessary. The principal is to have research skills, be able to find out all possible information about given topic and use parallel literature.

All this helps to recognize the flow of the text, and also the usage of the specialized terminology in different contexts. Also, if it is possible, it is convenient to have a specialist-consultant, who can help with the most specific terminology in case there is no other chance of detecting the right equivalent. Basically, the best way is to focus on topics the translator is at least interested in, and gradually move on to related subjects, as the vocabulary of a translator extends. There are many fields with common terminology, such

¹³ See Jody Byrne, *Technical Translation: Usability Strategies for Translating Technical Documentation*, 2-8.

¹⁴ See Jody Byrne, *Technical Translation: Usability Strategies for Translating Technical Documentation*, 2-8.

as some specializations in medicine or chemistry, where the major part of the expressions is the same, and some specific terms are added in every highly specialized sub-branch, so a translator can relatively easily start with topics he/she is interested in and then move to the related branches.¹⁵

¹⁵ See Jody Byrne, *Technical Translation: Usability Strategies for Translating Technical Documentation*, 2-8.

II. ANALYSIS

3 VALIDAČNÍ POSTUPY PRO TEST NA BAKTERIÁLNÍ ENDOTOXINY

3.1 Úvod

Bakteriální endotoxin je, díky své extrémní účinnosti a vysoké četnosti výskytu v přírodě, nejvýznamnější pyrogen ve výrobě parenterálních přípravků a zdravotnických prostředků. Pyrogeny lze najít na každém místě a v každé substanci, kde probíhá buněčné dělení. Nejdůležitějšími prostředky pro sledování pyrogenů je bioburden a testování endotoxinů. Záměrem tohoto pojednání je popsat dva typy LAL testů, používané k validaci postupů Testu na bakteriální endotoxiny (BET) v parenterálním průmyslu. Jako první tu jsou validační postupy, které prokazují nepřítomnost rušivých faktorů při použití BET k testování a propouštění parenterálních přípravků nebo zařízení. Dále zde najdeme validační postupy navržené tak, aby dokazovaly, že procesy depyrogenace odstraní nebo rozloží endotoxin až na požadovanou hodnotu.

Jsou zde srovnávány návody a příručky, zabývající se sledováním a měřením endotoxinu.

3.2 Validace testů na bakteriální endotoxiny pro léčiva a zařízení

LAL-Test Guideline

LAL-Test Guideline (FDA, 1987) byl nejvýznamnějším dokumentem, který se objevil během období, kdy činidlo *Limulus ameobocyte lysate* (LAL) začalo nahrazovat pyrogenní testy na králících. LAL-Test Guideline pobídl farmaceutický průmysl, aby novou technologii využil k definování specifických požadavků pro rychlý přechod k metodě LAL. Brzy vznikl zájem o dosud chybějící ne-endotoxické pyrogeny s LAL, ale existence neendotoxických a nebo syntetických pyrogenů v parenterálních výrobcích nebyla potvrzena věrohodnými důkazy. (Williams, 2001)

Guideline představil koncept Limitu endotoxinu (EL) založeného na dávkování, aby určil bezpečnou hladinu endotoxinu, a také stanovil pravidla pro ředění (MVD, maximální možné ředění) či koncentraci (MVC, minimální možná koncentrace) pro potlačení rušivých vlivů, a, v některých případech, i pro snížení extrémní citlivosti testu. Překvapivě zde chyběl přímý výpočet citlivosti testu. Průvodce má speciální části zabývající se testováním parenterálních léčiv a zdravotnických prostředků. Uvádí tři základní požadavky: kvalifikaci zařízení a činidel, validační test pro zajištění absence rušivých faktorů, jako je inhibice

gelů, a limitní (běžný) LAL test k propuštění parenterálních přípravků validovanou metodou. Tyto testy vyžadovaly série ředění endotoxinu od 2λ do $1/4\lambda$ k dosažení předpokládaného konečného bodu gelového činidla LAL a k potvrzení, že test proběhl v pořádku. Limitní test požadoval, aby tyto sady konečných bodů CSE byly zhotoveny v první sérii testů každý den dvakrát. Validační a kvalifikační testy čtyřikrát.

Přestože Guideline již není stěžejním dokumentem pro provádění LAL testů, postupy týkající se parenterálních přípravků byly sestaveny tak, aby se s ním doplňovaly. Zaměřil se na položky SVP, jako je vzorkování, retestování a určení poměrů RSE/CSE, které nejsou uvedeny v současnějších příručkách; takže se na něj stále bude odkazovat. Text K. Williama o endotoxinech (2001) obsahuje kopie originální verze. Nejlepšími zdroji informací o limitech endotoxinů jsou monografie léčiv a kapitoly ve farmaceutických kompendiích.

3.2.1 Harmonizovaný test bakteriálních endotoxinů (HBET)

Test na bakteriální endotoxiny (BET) začal být vysoce účinný v lednu roku 2001, kdy prodělal rozsáhlé změny. (USP, 2002) Tato revize byla schválena na Mezinárodní konferenci o harmonizaci. LAL-Test Guideline a nový BET jsou si nyní velmi podobné.

Nová kapitola zjednodušila postupy a popsala všechny metody LAL. HBET je nyní nejdůležitějším dokumentem pro regulační shodu, který obsahuje minimální standardy pro LAL testy a přináší celosvětovou jednotnost do BET. Tabulka č. 1 porovnává, jak jsou určité klíčové položky a požadavky popsány v obou dokumentech.

Tabulka č. 1: Srovnání požadavků LAL-Test Guideline a Harmonizovaného BET

Požadavek	Srovnání a poznámky
Plasty	HBET doporučuje sledovat interferenci z plastů
Endotoxin	LAL-Test Guideline umožňuje RSE nebo CSE; HBET popisuje pouze RSE
Stanovení RSE/CSE	Guideline umožňuje stanovení poměru; v HBET není určeno
Zkouška pH	Oba měří pH vzorku/LAL směsi a vyžadují neutrální hodnotu
Validace metody LAL	Guideline vyžaduje 3 zkoušky; HBET

	neudává počet
Revalidace	Požadovaná oběma při změně dodavatele LAL nebo při změně složení léčiva, ale HBET nestanovuje počet zkoušek
MVD	Výpočet stejný v obou dokumentech
Limit endotoxinu	Výpočet stejný v obou dokumentech
MVC	Výpočet uveden pouze v Guideline
Upozornění na štítku, nová dávka LAL	Oba vyžadují čtyři série ředění
Upozornění na štítku, běžný test	Guideline vyžaduje série CSE s první sadou denních testů; HBET nepožaduje série CSE s limitní zkouškou, pouze vzorek gelové sraženiny
I/E zkouška gelové sraženiny	Oba dokumenty srovnávají obnovu pozitivní kontroly
Vzorek gelové sraženiny (koncový bod)	HBET požaduje série CSE v kvantitativní analýze
Kvalifikace	Způsobilost laboratoře a zařízení popisuje pouze Guideline
Retestování nebo OOS	Guideline popisuje retestování; CGMP prozkoumání OOS; v HBET není popsáno
Glukany reagující s LAL	HBET připouští testování pod podmínkami specifickými pro endotoxiny
Vzorkování	Guideline doporučuje vzorkovat na začátku, uprostřed a na konci pokusu, v HBET nestanoveno
Kritéria standardní křivky	Stejně v obou dokumentech, nové činidlo je třikrát testované
Regresní analýza	Guideline vyžaduje lineární regresi; HBET typ regrese neuvádí
Pozitivní kontrola v kinetice	V Guideline rozsah $100 \pm 50\%$, ale v HBET 50 – 200%

Legenda: HBET = harmonizovaný BET; I/E = interference/enhancement; OOS = výsledky mimo specifikaci

Nejdůležitějším dokumentem pro regulační shodu ve vybavení pro LAL jsou standardní operační postupy (SOP). V ideálním případě by SOP měly podstupovat každoroční aktualizace, aby se vyvíjely stejně tak jako průmysl. HBET byly rozšířeny, aby zahrnuly i metody pro fotometrické (metoda kinetická a metoda koncového bodu) LAL testy, což je zjevně efektivnější způsob provádění testu.

Některé z položek testu, které by LAL laboratoře mohly chtít aktualizovat při přechodu na HBET jako na stěžejní referenční dokument, jsou:

- Kontrola hodnoty pyroburden v plastech a depyrogenace zařízení
- Redukce četnosti sérií ředění v Kontrolních standardech endotoxinu (CSE) v limitních zkouškách gelových sraženin
- Popis vzorku gelové sraženiny, použité pro kvantitativní test
- Testy na glukany reagující s LAL, jsou-li nutné
- Pokyny pro řízení výsledků BET mimo specifikaci (OOS)
- Přijetí určení poměru podle Referenčního standardu endotoxinu (RSE)/CSE od prodejce LAL/CSE

Nejlepší způsob, jak se vypořádat s dokumenty týkajícími se LAL, je minimalizovat počet operačních postupů a vytvořit je co možná nejvíce detailní. Postupy by mohly být omezeny na:

1. Kvalifikaci zařízení a činidel;
2. Postup testu pro všechny druhy dokončených i rozpracovaných výrobků a surových látek;
3. Kvalifikaci testovaných vzorků s ohledem na interferenci.

Typický postup při testování léčiv je popsán v tabulce č. 2. Pro testování zdravotnických prostředků byl postup upraven tak, aby charakterizoval různé typy protokolů pro extrakci ze zařízení. Speciální postup BET pro každý produkt není příliš vhodný, pokud je potřeba provést pouze malou změnu ovlivňující všechny typy testů. Kontrola každého dokumentu byla příliš komplikovaná.

Tabulka č. 2: Části standardního operačního postupu BET ve farmaceutice

Cíl a rozsah postupu

Odpovědnost za vytvoření a aktualizaci dokumentu

Referenční dokumenty, zahrnující předpisy, shrnutí, související SOP a další formuláře

Definice termínů spojených s BET

Materiál a vybavení

Stanovy uvádějící potřebný počet kvalifikovaného zařízení a činidel

Postupy BET zahrnující:

Příprava a skladování kontrolní standardů endotoxinu (CSE)

Rehydrace a skladování činidel LAL

Příprava vzorků vody a ostatních ne-interferenčních látek k testování

Příprava nedokončených výrobků pro testování platnou metodou, pokud je to možné

Inokulace, inkubace a definice výsledků vzorků testovaných metodou gelové sraženiny

Inokulace, inkubace a definice výsledků vzorků testovaných kinetickou LAL metodou

Interpretace výsledků a podmínek pro platnost vzorků a testu

Řízení výsledků mimo specifikaci

Nejlepší volba je zařadit tabulku do části popisující ředění jednotlivých látek a nebo zacházení s látkami před použitím v BET.

3.2.2 Validace metod BET pro nové chemické sloučeniny (NCE)

Validace metod BET je navržena tak, aby zdokumentovala, že procedura BET detekuje endotoxiny v daných vzorcích léčiv či v extraktu ze zařízení bez jiných rušivých vlivů. Klíčem k úspěšnému validačnímu projektu jsou správné postupy a kvalitní dokumentace. BET validace nové chemické sloučeniny (NCE) slouží jako prostředek k diskusi o vzorovém validačním postupu, který je nezbytný pro uvedení nových parenterálních přípravků na trh.

LAL test je pochopitelně stabilní a bez jakýchkoli rušivých vlivů, jako je zvýšení hodnot či inhibice. Obecně, pokud je pH testované látky neutrální, látka je vysoce rozpustná ve vodě, obsahuje minimální chelátová činidla pro bivalentní kationy a obsahuje soli či rozpustné látky pouze v malé koncentraci, výkyvy se nevyskytují, nebo jsou minimální.

Proces validace začíná, když je v laboratoři pro testování endotoxinů představena nová chemická sloučenina. BET validace nové látky požaduje progresivní postup, počínající

množstvím NCE a končící finálním vzorcem látky. Validace může být potřebná i během fundamentálních částí procesu a u rozhodujících pomocných látek. K urychlení validace v laboratoři BET jsou nezbytné vstupní informace, poskytnuté výrobcem léčiva:

- Vstupní odhad dávky vzhledem k limitu endotoxinu;
- Údaje o rozpustnosti ve vodě a vodou ředitelných organických rozpouštědlech;
- Informace o původu materiálu (přírodní nebo syntetický zdroj);
- Opatření nutná pro laboranty při práci s látkou

3.2.2.1 Limit endotoxinu

Bývá nemožné dodat zcela apyrogenní látku, protože endotoxin je stálý, velmi účinný a velmi rozšířený v přírodě. Nicméně, limit endotoxinu (EL) představuje nejbezpečnější množství endotoxinu, které je povoleno v dávce daného parenterálního přípravku. Toleranční limit ve vzorci K/M se liší podle typu látky a způsobu administrace, jak je popsáno v tabulce č. 3. Například, rozvoj aseptické meningitidy u pacientů podstupující intratekální léčbu, vedl k přísným omezením pro léčiva spravovaná tímto způsobem. (Cooper a Harbert, 1975) Limit endotoxinu příslušný k danému produktu nalezneme v lékopisné monografii daného léčiva. EL nové sloučeniny je určen tímto vzorcem v závislosti na množství:

$$\text{Limit endotoxinu (EL)} = K (\text{toleranční limit})/M (\text{maximální dávka/kg/h})$$

Na počátku vývoje NCE mohou být informace o dávkování nedostupné. Kvůli snaze o co nejúčinnější léčiva bude limit endotoxinu 1 EU/mg postačující, dokud nebude léčivo připraveno pro klinické studie. Rozsah ředění rozptylující rušivé vlivy je omezen MVD nebo MVC. MVC je koncentrace maximálně zředěné (MVD) NCE při specifických testovacích podmínkách citlivosti a ředění. MVC je v těchto případech použitelnější, protože NCE je obvykle představována ve formě prášku, který musí být zváženo a před testováním rozpuštěno.

Tabulka č. 3: Toleranční limit endotoxinu v parenterálních přípravcích

Typ parenterálního přípravku	Toleranční limit endotoxinu (K)
Léčiva nebo veterinární léčiva a biologické látky	5 EU/kg

Parenterální přípravky podané intratekální injekcí	0,2 EU/kg
Radiofarmaka	175 EU/V ⁺
Intratekální radiofarmaka	14 EU/V ⁺
Velký objem parenterálních přípravků	0,5 EU/ml
Voda na injekce	0,25 EU/ml
Zdravotnická zařízení podle původu	0,5 EU/ml až 20 EU/zařízení
Zdravotnická zařízení v intratekálních prostorech	0,06 EU/ml až 2,15 EU/zařízení
Několikanásobná příměs parenterálního přípravku v malém množství	70 EU/V ⁺ *
Nová chemická sloučenina, předběžně	1 EU/mg [*] dokud není známa dávka pro člověka
+ Maximální dávka v množství (ml). * Limit doporučený autory, ne lékopisem.	

3.2.2.2 Rozpustnost

BET je test na vodní bázi. Údaje o rozpustnosti NCE ve vodě a běžných vodou ředitelných rozpouštědlech jsou nezbytné, obzvláště pokud je NCE obtížně rozpustná ve vodě. Je vhodné rozpustit NCE ve směsi vody a rozpouštědla, a poté ji rozředit na koncentraci, kdy je rozpustná i spojitelná s LAL. Například, činidlo LAL bude tolerovat 5% (v/v) etanolu ve vodě a 1% (v/v) směs voda/DMSO (dimethylsulfoxid). Látku rozpouštíme v anorganické nebo organické kyselině, nebo v základu vhodném k vytvoření ve vodě rozpustných solí. V tomto případě nízká hodnota molární koncentrace činidla zabraňuje neutralizovat extrémní rozsah pH a možnou redukci přírodního endotoxinu. Znalost původu látky pomáhá definovat hodnoty, které by měly být sledovány. Pokud byla NCE vyvinuta v podmínkách, které podporují růst bakterií, hodnoty bioburden a pyroburden jsou vyznačeny.

Rekombinantní léčiva vzniklá fermentací mohou mít vysokou koncentraci endotoxinu a během purifikačních procesů je třeba jeho hladinu sledovat. Biologický materiál může obsahovat enzymy, které musí být tepelně denaturovány.

3.2.3 Kompatibilní profil stanovený LAL metodami kinetickou a gelové sraženiny

Ředění testované látky pomocí LAL apyrogenní vody (LRW) je nejlepší cestou jak předejít rušivým vlivům. Jak je naznačeno v BET, k takové úpravě testované látky, aby se předešlo inhibicím jako je například filtrace či zahřívání, je třeba mít zdokumentovanou validaci. Ta ukáže, zda modifikace nepodcení žádný přírodní endotoxin, který by mohl být v látce přítomen.

Upřednostňovaný způsob, jak zjistit kompatibilitu LAL s NCE, je zkoumání obnovy endotoxinu s klesající koncentrací testované látky. Pro test na rušivé faktory se připravuje série ředění NCE v polystyrenových zkumavkách, nebo apyrogenním skle pro testování LAL k určení vhodné koncentrace LAL, definované jako takovou, která dovoluje obnovu pozitivní kontroly (PPC) endotoxinu. Pro dobře rozpustné materiály je vhodné připravit dvousložkové (1:2) ředění pomocí apyrogenní vody (LRW) a provést obnovu pokusu v rozsahu 8 až 0,1 mg/ml. Jiné hodnoty mohou být pro vzorek vhodnější díky vyšší ředitelnosti či odhadům dávek. Méně ředitelné nebo více potentní látky mohou být pozorovány podobným způsobem na úrovni 1 mg/ml a méně, nebo podle nejlepší rozpustnosti ve vodě. V ideálním případě je kompatibilní koncentrace rozpoznána pomocí metody gelové sraženiny a potvrzena turbidimetrickou kinetickou metodou (KTA). Nezbytností je materiál, činidla a lidské zdroje nutné k dokončení validace BET. Je úsporné validovat několik LAL metod a dodavatelů současně, protože náklady i námaha vynaložené na přípravu vzorku a dokumentace jsou pro dvě metody stejné jako pro jednu. Některé regulační agentury chtějí pro validaci NCE vidět údaje z kinetické metody i metody gelové sraženiny LAL.

Jedna dávka NCE je postačující pro interferenční screeningovou studii oběma metodami gelové sraženiny i KTA. Tabulka č. 4 ilustruje kompatibilitu LAL a profil pH syntetických antibiotik, které byly rozpuštěny pomocí minimálního množství zředěného roztoku kyseliny sírové, k vytvoření sulfátové soli, a zředěných na 8 mg/ml. Ředění látky v LRW byly připraveny od 8 do 0,1 mg/ml. Všechna ředění pomocí LRW byla negativní, dokazující, že ve vzorku s úrovní 1 mg/ml, první validní obnovy PPC, nebyl ani náznak endotoxinu. Při 1 mg/ml, činidlo gelové sraženiny bylo pozitivní, ale KTA obnovila PPC na konzistentních 0,5 mg/ml a méně. Další koncentrace byla plánovaná pro další validační studie. Termín „neinhibiční koncentrace (NIC)“ je klamavý, protože nejvyšší koncentrace k obnově 2λ PPC v gelové sraženině může být dosažena pouze pomocí 50% obnovy.

Tabulka č. 4: Profil kompatibility sulfátové soli syntetických antibiotik ručený metodou gelové sraženiny a metodou KTA

LRW (LAL apyrogenní voda) byla používána k přípravě ředění látek. PPC (pozitivní produktová kontrola) v gelové sraženině připravené z 10 µL CSE 20-λ. Hodnota PPC v KTA (turbidimetrická kinetická metoda) ve středu mezi 5 až 0,05 EU/ml na standardní křivce.

Potence (mg/ml)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,1
LRW/NCE studie gelu	--	--	--	--	--	--	--
2λ výtěžnost PPC	--	--	++	++	++	++	++
% výtěžnost 8 PPC	22	52	69	89	103	98	
LAL/vzorek	5.8	6.1	6.5	6.8	6.9	6.9	6.9

Screening kompatibility, nebo studie kvalifikace vzorků mohou být provedeny ředěním jedné sady zkumavek s LRW a ostatních s ředěním 2λ. Nicméně, „hot-spike“ metoda byla používána k přípravě každé PPC. Pro maximální efektivitu byla provedena analýza vytvořením jedné sady látky ředěné LRW, naočkováním čtyřech zkumavek vzorky koncentrátů každé látky, a na konec přidáním 10 µ L z dávky 20-λ do dvou PPC zkumavek v každé sadě. Při kinetické LAL metodě je potřeba minimálně 75% obnova k ujištění, že pro pokusy s validací vzorků byla vybrána koncentrace neinterferenční a schopná reprodukce.

3.2.3.1 Účinek pH

FDA předpokládá pH profil kvůli jeho vlivu na inhibici. Pokud testovaná látka (vzorek a směs LAL) není neutrální, předpokládá se, že nejextrémnější pH specifikace je neinterferenční. Například, pokud pH specifikace látky je 4 až 6, pokusy musí prokázat, že v případě že je látka upravená na hodnotu pH 4, z validované metody vznikne neutrální směs zředěné látky a činidla LAL.

Kompatibilita LAL a pH profilu dokumentují, jak efektivně ředění rozpouští inhibice, a jak metoda gelové sraženiny a kinetická metoda srovnávají citlivost. Profil také může identifikovat kontaminaci glukany, pokud jsou obnovy PPC v kinetické studii opravdu výrazné. (Cooper et al., 1997) Rozhodující je pH výsledku testu, obzvláště v kinetické studii LAL. V ideálním případě je pro nejlepší obnovu endotoxinových kontrol pH standardu a vzorků 0,1 pH jednotek. Piluso (1999) demonstroval sílu profilů kompatibility ve validaci BET pro liposomy.

Cyklus BET validace látky vyžaduje kvalifikaci vzorků v různých stádiích procesu. Výzkum konečné formulace může zvýšit nebo snížit inhibiční podmínky. Například, kombinace API, pomocných látek, stabilizátorů a pufrů může významně změnit kompatibilní profil konečné látky. Z metody BET validace konečné látky může vzniknout proces, který se od API velmi liší.

3.2.3.2 *Test citlivosti*

Pro zjištění dostatečné citlivosti testovacích podmínek, musíme srovnat citlivost koncentrace kompatibilní s LAL (LAL-CC) s limitem endotoxinu. Pokud nemáme informace o dávkování, limit endotoxinu bude libovolně přidělen podle tabulky č. 4 1 EU/mg pro antibiotikum. Při 0,5 mg/ml byly metody LAL dostatečně citlivé, aby dosáhly orientačního limitu. Citlivost testu při LAL-CC 0,5 mg/ml byla 0,1 EU/mg podle metody KTA a 0,125 při použití metody gelové sraženiny, kde je citlivost λ rozdělena koncentrací testu (TC). Kvůli významné inhibici vzniká potřeba citlivějších metod.

Citlivost dané látky (PSS) pro KTA = 0,05 EU/ml/0,5 mg/ml
= 0,01 EU/mg

3.2.3.3 *Kritická hladina endotoxinu (EAL)*

ALE je interní specifikace pro 4-5 krát účinnější API, než je limit endotoxinu konečné látky. Hodnota EAL pro API se stává patrnější, následuje řada pyrogenních reakcí (1998-9), které byly způsobeny kontaminovaným množstvím gentamycinu. (Fanning, 2000) Mnoho reakcí bylo spojeno s hladinou endotoxinu, která byla stejná nebo nižší než limit. EAL představující 25% redukci limitu konečné látky je vhodná pro léčiva vyrobená fermentací nebo pomocí rekombinační technologie, provedené aseptickým způsobem a připravované pro IV nebo intratekální aplikaci.

3.2.3.4 Případové studie

Výsledky validačních pokusů BET na problematických NCE jsou shrnuty v tabulce 5. Konzervativní, předběžný limit endotoxinu byl NCE přidělen s rozpustností ve vodě 2,5 mg/ml. Běžné třídění kompatibility LAL a pH bylo provedeno pomocí gelové sraženiny (GC) a činidel KTA. Rozpustnost omezovala třídění kompatibility mezi 2 až 0,05 mg/ml. Plná výtěžnost PPC byla objevena při 0,25 mg/ml, kompatibilní koncentraci (CC), ale citlivost při popsáných podmínkách (PPS, citlivost dané látky) byla velmi blízko ke koncentraci limitu endotoxinu. Upřednostňuje se bezpečné rozpětí (poměr EL k testu citlivosti) minimálně 4, takže citlivější test by ukázal větší rozpětí. Standardní křivka KTA od 1 do 0,01 EU/ml je pro vyšší citlivost nejlepší. Kritická hladina endotoxinu byla stanovena na 0,1 EU/mg na množství léčiva nebo API.

Tabulka č. 5: Shrnutí validačních studií NCE pomocí metody gelové sraženiny a metod KTA

Předběžný limit endotoxinu	0,4 EU/mg založený na 12mg/kg/dávka IV
Rozpustnost	2,5 mg/ml
Citlivost činidla LAL	GC @ 0,06 EU/ml a KTA @ 0,05 EU/ml
MVC měřená λ /EL	GC @ 0,15 mg/ml a KTA @ 0,125 mg/ml
MVD	Není aplikovatelné na pevné látky
Kompatibilní koncentrace LAL (CC)	0,25 mg/ml pro GC a KTA
pH LAL/NCE @ směs @ CC	6,9 proti 7,0 pro směs LRW/LAL
Citlivost (PPS = λ /CC) při hodnotách λ viz výše	0,25 EU/mg pro GC, 0,2 EU/mg pro KTA
Míra bezpečnosti (MS = EL/PSS)	1,6 pro GC a 2 pro KTA
Citlivost při 0,01 EU/ml pro KTA	0,04 EU/mg
Míra bezpečnosti pro citlivější analýzu	10 při nízkém standardu v KTA = 0,01 EU/ml
Kritická hladina endotoxinu	0,1 EU/mg zadaná QA/RA

Legenda: GC je gelová sraženina a KTA je kinetická turbidimetrická metoda. MVC je minimální možná koncentrace

3.2.3.5 Výkaz o validaci BET

Detailní výkaz o validaci je zaměřený na všechny složky, které mají vliv na přesnost testu a regulační schody. Tabulka č. 6 ilustruje shrnutí třífázové validace obnovení PPC a neutrality pH. Výkaz by měl zahrnovat následující:

- Detailní popis látek, vybavení, softwaru a metod
- Výpočty, jako například limit endotoxinu, kritická hladina endotoxinu a citlivost testu
- Výsledky pokusů a významné problémy, které byly vyřešeny
- Popis přípravy vzorků a hodnocení reprodukovatelnosti
- Závěr, že validovaná metoda je neinterferenční a pH neutrální

Tabulka č. 6: Přehled měření obnovy endotoxinu a pH

Gelová sraženina LAL				Kinetická LAL	
Dávka	PWC	PPC	pH	Obnova (%)	pH
A	0,0625	0,031	6,9	114	6,9
B	0,031	0,031	7,0	88	7,0
C	0,0625	0,037	7,0	96	7,0

PWC: pozitivní vodní kontrola; PPC: pozitivní produktová kontrola; pH: koncentrace vodíkových iontů

Ještě před přijetím harmonizované verze BET se objevily pochyby, zda kinetické metody LAL podléhají USP, chapter 1225, ohledně validace doprovodných metod. Nicméně, nový BET přesně popisuje všechny fotometrické či kinetické metody a podmínky LAL. Analytická metoda splňuje specifické požadavky na přesnost a věrohodnost.

3.2.3.6 Zdravotnická zařízení

BET validace zařízení zde nebyla nijak zdůrazněna, protože ze zařízení jsou jen zřídka vytvářeny vzorky, které potlačují či stupňují BET. Nejdůležitější validační zkouškou je vývoj takového extrakčního postupu, který plně určí, kudy bude v zařízení kapalina procházet. Endotoxinová zátěž a výtěžnost endotoxinu ze zařízení není požadována, protože FDA seznala takovou extrakci nevyhovující. Sekce Background v LAL-Test Guideline vydaným FDA naznačuje, že přísné limity endotoxinu rovnající se 20

EU/zařízení, byly vytvořeny kvůli domnělému neúplnému odstranění endotoxinu během běžného testu LAL. (FDA, 1987)

3.3 Validace postupů depyrogenace pomocí metod BET

Guideline FDA a harmonizovaný BET jsou napsány kvůli zveřejnění testování parenterálních přípravků. Nicméně, pozorování konečného produktu tvoří relativně malou část LAL testů provedených na většině parenterálních zařízení. Většina z testů je aplikovaná na sledování vody a výchozích látek (jako jsou API, pomocné látky, pufrů a ostatní složky) v průběhu zkoušky, kvůli zajištění nepřítomnosti endotoxinu v konečné látce. Tabulka č. 7 shrnuje doporučení k testování endotoxinů a pyrogenů, které jsou popsány v aktuálním USP. (USP, 2002) USP neudává způsob úpravy testu pro účely, jakou je validace depyrogenace komponent pro sterilní postupy. Je vhodné zpracovat testy použité na vodu a na sterilní postupy jako USP limitní test a použít ekvivalentní kritéria pro platnost testu.

Tabulka č. 7: Odkazy na Test na pyrogeny nebo na Test na bakteriální endotoxiny v USP 25-NF 20

Hlavní kapitoly		Shrnutí požadavků
<1>	Injekce	Vehikulum pro vodní injekce splňující požadavky Testu na pyrogeny a nebo BET
<11>	USP referenční standardy	Použití a uchování USP RS endotoxinu
<85>	Test na bakteriální endotoxiny	Harmonizovaný BET se všemi LAL metodami; postupy a interpretace
<151>	Test na pyrogeny	Postup a látky pro test na pyrogeny prováděný na králících
<161>	Komplety pro transfúze a infúze & podobná zdravotnická zařízení	Rozsah testu; postupy pro získávání extraktu ze zdravotnického zařízení; limit 20 EU na zařízení
<823>	Radiofarmaceutika pro sloučeniny PET	Instrukce pro průběh a ukončení testu s krátkodobými radiofarmaky
<1041>	Biologické látky	Test na pyrogeny a BET krevních přípravků

<1045>	Biotechnologické artikly	Endotoxin zjištěný pomocí BET nebo Testu na pyrogeny
<1078>	Způsoby zpracování	Výrobce pomocné látky ručí za absenci pyrogenů, pokud je to požadováno v lékopise
<1211>	Sterilizace a bezpečná sterilizace pomocných prostředků	Tisícinásobná redukce známého množství odpovědi na endotoxin jako součást validace pece
<1231>	Voda pro farmaceutické účely	Kritéria pro výběr farmaceutických vod; 0,25 limit EU/ml pro WFI; žádný limit pro vodu v průběhu testu

3.3.1 Metody depyrogenace

Endotoxin má dobrou teplotní stálost a je obtížné ho zničit chemicky. Prostředky použitelné k eliminaci endotoxinu jsou obvykle drahé. Depyrogenace odkazuje na jakýkoli postup, který je vytvořen k odstranění nebo zničení endotoxinu. Je uskutečňována pomocí technik, jako jsou destilace či ultrafiltrace, oxidace peroxidu, promytí a sterilizace teplem. Všechny depyrogenační postupy vyžadují validaci metodou BET.

Stručný přehled o endotoxinu pomáhá vysvětlit, jak depyrogenace prováděna. Environmentální (nečištěné) endotoxiny obsahují lipidy, karbohydráty a proteiny, a mají běžnou strukturu hydrofilního polysacharidu s kovalentní vazbou na hydrofilní oblast známou jako Lipid A. Zatímco polysacharidní oblast je vysoce proměnlivá mezi různými gram-negativními koloniemi bakterií, oblast Lipid A v molekule je pozoruhodně konstantní ve své struktuře, farmakologické aktivitě a schopnosti aktivace LAL. Endotoxiny jsou bakteriální kolonie s negativním nábojem, velikosti 20-30 tisíc daltonů až 10^6 daltonů, s velikostí kolísající podle původu bakterie a přítomnosti bivalentních kationů nebo biologických detergentů. Velká polysacharidní část endotoxinu ho činí poměrně dobře rozpustným ve vodě a snadno odstranitelným z většiny látek. Purifikovaný endotoxin, používaný ve validačních studiích, je méně rozpustný než přírodně se vyskytující endotoxin, protože nemá vazbu s proteinem. Tudíž, použití čištěného endotoxinu představuje tu horší možnost pro studie obnovy endotoxinu, protože je obtížnější ho vymýt a je náchylný k agregaci, která zahajuje obnovu.

3.3.2 Validace systému vody na injekce (WFI)

Destilace byla prvním postupem vyvinutým pro depyrogenaci vody. Ultrafiltrace, destilace a reverzní osmóza (RO) efektivně odděluje endotoxiny od vody díky velikosti molekul. Dnešní vodní systémy obvykle při úpravě vody kombinují destilaci a RO. Validace nového systému WFI je zdlouhavá a je zapotřebí mnoha vzorků. (Meltzer, 1995) Je nereálné vůbec přemýšlet o validaci nového systému bez použití kinetické LAL metody, podpořené mikrotitrační destičkou a čtečkou zkumavek, se softwarem vytvořeným konkrétně pro endotoxiny.

Software je vhodný pro sběr a analýzu údajů, stejně jako pro uchovávání výsledků pozorování pro následující trendové analýzy. (Cooper, 2001)

FDA předpokládá intenzivní testování endotoxinu a hodnoty bioburden během validace nového vodního systému. Po dobu jednoho měsíce během druhé části Instalační kvalifikace je nezbytné odebírat vodní vzorky z míst proti proudu (napájecí voda, jednotky RO, směsné lože, nádrž, atd.), i z každého místa spotřeby ve WFI kličce. Například, denní vzorky jsou odebírány o 4 až 6 týdnů déle během Operační kvalifikace, přičemž je dokumentována adekvátnost postupů a systémů. Poté se četnost vzorkování v každém bodě může zredukovat na týdenní u WFI kličky a měsíční nebo i méně četnější pro ostatní, méně riziková místa. To znamená, že ne každé místo je testováno denně, ale pokles testovaných bodů ve WFI kličce může být nahrazeno během Procesní kvalifikace, kdy je hodnocen i vliv sezónních výkyvů. Hlavní zdroj endotoxinů není napájecí voda, ale rozvoj biofirmy v systému, nebo kolonie bakterií ve směsných ložích a ostatních místech, kde se zachycují mikrobi.

Rozsah standardní křivky kinetického BET ukazující citlivost činidla gelové sraženiny, by měl být stanoven ještě před začátkem validace. Rozsah 5 až 0,05 nebo 10 až 0,01 EU/ml při kinetické turbidimetrické metodě (KTA) je vyhovující a dostatečně široký pro měření vzorků z míst bez ředění nejvíce proti proudu. Můžeme běžně vidět 0,1 EU/ml jako regulační mez a 0,05 EU/ml jako úroveň výstrahy pro pokles bodů ve WFI kličce. Žádné endotoxiny nebo limit CFU nejsou indikovány v dalších vzorkovacích místech, protože jediným zájmem je zde identifikovat hodnoty endotoxinu, které se liší od historických dat, a pokud je to možné, podniknout vhodné preventivní kroky. Například, pokud historické údaje ukázaly, že úrovně ve směsném loži nepřekročily 0,1 EU/ml, a pozorované úrovně dosahují více než 0,1 EU/ml, je možné že je potřeba regenerovat směsné lože.

Dalším zájmem je test pro interferenční faktory související s LAL testem. Voda není inhibiční, ale nádoba pro sběr vody může být zdrojem inhibice. O určitých plastech je známo, že do testovaného vzorku absorbují endotoxiny nebo uvolňují silné inhibitory. Nicméně, je nezbytné vybrat minimálně dvě nádoby jako součást validačního postupu. Jsou dostupné nové, tepelně odolné, inertní a nerozbitné plasty, jako alternativa ke skleněným apyrogenním nádobám. Další zdroj interference v kinetických metodách LAL je enhancement způsobený nelinearitou standardní křivky.

Úspěch validační studie je z velké části závislý na tom, jak důsledně jsou údaje uchovávány a spravovány, stejně tak jako na způsobech jejich sběru. Aplikace kinetické metody LAL a softwaru pro trendovou analýzu poskytuje příležitost k vytvoření mohutného systému pro sběr a řízení údajů o endotoxinu. Diagram č. 1 popisuje nastavení šablony pro sledování systému WFI pomocí KTA metody, která by mohla být použita během validace. Pro zahájení každodenního pozorování by měla být šablona aktivovaná a měl by do ní být vložen soubor čísel. Tímto číslem je většinou datum sběru. Po uplynutí období denního sběru, by šablona mohla být upravena tak, aby odpovídala zjednodušenému testování, ale jméno látky či identifikace místa sběru by zůstalo zachováno k usnadnění trendové analýzy.

4 ANALYSIS OF THE TRANSLATION PROCESS

4.1 Analysis of the Source Text

According to the Mgr Martin Djovčoř, the text analysis is a conceptual division of a complex semantic entity into its phonetic, morphological, syntactic, lexical and stylistic components and the observation of their relevance in the process of reception.

For our needs, a complete analysis of the source text is unnecessary, but I would like to mention at least some basic issues, such as its origin, authors, purpose and its presupposed recipients.

4.1.1 Background of a Source Text

Name of the document analyzed is *Validation procedures for the bacterial endotoxins test* written by James F. Cooper and Cheryl Moses. It was published by Davis Healthcare International Publishing in USA in September 2004. Originally, it was part of the *Laboratory Validation; a Practitioner's Guide* - its 28th chapter. Individual chapters of this book are written by different authors-specialists and it was published in November 2003.

4.1.2 The Purpose and Form of the Text

The text is designed for specialists in chemistry or microbiology who are interested in current laboratory validation, a high level of technical knowledge of its recipients is expected by the authors. Originally, the text was written as a part of coherent unit which should support or develop the addressee's knowledge of the specific and highly specialized problems.

The document is in a written form, it helps to spread the information among interested people all over the world, but it isn't typical technical text. According to commonly known rules, technical text is usually defined by poor syntax, application of nouns and by usage of passive voice and strict division of theme and rheme in the sentence, especially when speaking about exact sciences. The sciences appearing in the text are chemistry, microbiology and pharmacology and with no doubt they belong into exact sciences, but the deal of the text is to compare another two highly specialized documents, *LAL-Test Guideline* and *HBET*, and it means that its stylistic approach is more complex. It is kind of discussion, not only technical description of some process. From the viewpoint of translating, it is easier to translate text which includes wider spectrum of syntactic means,

because it makes it more similar to the usual way of expressing and the translation process is more suitable for translator unskilled in such a specific field.

4.2 Translation Analysis

Because the translation of such a specific text is very demanding process for a nonprofessional, it is necessary to get as much information as possible about a given field. During the translation, a very good helper is the Internet, because of its versatility in searching for information, but the best option is the help of some specialist, who is able to explain the processes described in the text and correct the usage of technical terminology. Unfortunately, parallel literature on given topic in Czech language is very poor, so sometimes the assistance of the consultant is essential.

In this translation analysis, some specific features of technical text occurring in translated document will be presented, together with their Czech equivalents.

4.2.1 Infinitive, Gerund and Participle Structures

It is quite a common way how to express verb phrase of a sentence in more limited way.

Gerund is a verbal form ending with *ing* suffix and working as a noun in the sentence.

The most often appearing phenomenon in given text is *to infinitive*, two other phenomena are not used so frequently. However, it was already mentioned that the text is not highly technical. More than gerunds or participles, *expletive IT* is used, especially in combination with modal verb *may*.

Examples:

Gerund:

... *the study was conducted **by making** one set of ...*

... *byla provedena analýza **vytvořením** jedné sady...*

... *issues such as **sampling and retesting** of ..*

... *položky jako **vzorkování a opakování** testu...*

Participle:

... *compatible concentration is identified **using** a gel-clot method ..*

... *je kompatibilní koncentrace rozpoznána **pomocí** metody gelové sraženiny...*

Infinitive:

*The sensitivity of the LAL-compatible concentration (LAL-CC) must be compared with the endotoxin limit **to determine** if test condition are sufficiently sensitive.*

***Pro zjištění** dostatečné citlivosti testovacích podmínek, musíme srovnat citlivost koncentrace kompatibilní s LAL (LAL-CC) s limitem endotoxinu.*

*It may be useful **to dissolve** a material...*

*Je vhodné **rozpustit** látku...*

4.2.2 Expletive IT + THERE

Expletive IT and THERE are used to express some information in impersonal way, such as for example passive voice. In given text, expletive *it* is occurring mainly with modal verb *may* followed by *infinitive* without *to* (*bare infinitive*). In translated text, modal verb *may* is somehow moderation the directness of statements:

***It may be impossible to render** materials absolutely pyrogen free because...*

Bývá nemožné dodat zcela apyrogenní látku, protože...

***It may be useful to dissolve** a material...*

Je vhodné rozpustit látku...

The structure IT + MAY + BE is followed by adjectives evaluating following activity, which is expressed in form of to infinitive.

Examples of expletive THERE in the text:

...there are validation procedures that document..

... existují validační postupy, které dokumentují...

...There was early concern about...

... Brzy byl zájem o...

4.2.3 Passive Voice

Although the translated document is not characteristic technical text, relatively high incidence of passive structures can be observed as well. They are used in situations when author or doer of the action is not relevant or even known, such as in example 1, or in case the doer (agent) of the action is new information (rheme) carried at the end of the sentence (example 2).

Example 1:

*BET method validation **is designed** to document that...*

Validace metody BET je navržena tak, aby zdokumentovala, že...

Here we can see equivalence of passive voice used in both source and target languages.

Pyrogen is found on....

Pyrogeny můžeme nalézt na...

In this example, passive voice used in English sentence is translated with an impersonal subject *we*, because Czech translation with *..je nacházen..* would be very unnatural.

Example 2:

*The EL for a new entity is **determined** by this dose-related formula:*

*EL nové sloučeniny je **určen** tímto vzorcem v závislosti na množství:*

The equivalence in passive voice is visible on this example, as well as the agent – *the dose related formula* is the doer of the action of determining, it is new information – *rheme* – added in the end of the sentence with usage of *by* preposition.

*... how certain key issues and requirements **are addressed** by the two documents.*

*...jak **jsou** určité klíčové body a požadavky **popsány** ve dvou dokumentech.*

Here we can see the diversity of Czech and English treatment of agent in passive structures. In English sentence, those *two documents* are the “agents” of addressing, meanwhile in Czech the translation *ve dvou dokumentech* refers more to the location of the action than to its doers.

4.2.4 Lexical Means and Terminology

Specific terminology appearing in the text doesn't originate in one branch of science. The scope of the text is balancing between chemistry and microbiology, or perhaps pharmacy. Translation of some terms requests intimate knowledge of the field, which the translator can compensate by usage of parallel literature or by consultation with a specialist. The best is combination of both.

Examples of specific terminology with Czech equivalents:

Pyrogen (pyrogen); Parenteral products (parenterální přípravky); Gel-clot (gelová sraženina); reagent (činidlo); drug (léčivo); device extraction (extrakce ze zařízení); analysts (zařízení); solubility (rozpustnost); new chemical entity (nová chemická

sloučenina); *intrathecal injection* (*intratekální injekce*); *sulfuric acid* (*kyselina sírová*); *Pharmacopoeial monographs* (*Lékopisná monografie*); *material-mediated pyrogens* (*syntetické pyrogeny*)

Naturally, there are also some examples of *half-terminology*¹⁶, which is very often used not only in technical writings, but in the majority of specialized literature. These are words such as *process, feature or procedure*.

4.2.5 Noun Groups

Compound is a lexical unit consisted of two or more words. Compounding is one of the most often used methods of creating of new words and compound words are frequently used in common, as well as in technical English. In technical English, compounds are very popular for creating of a special terminology. Czech translation, using adjectives and prepositions in a description process, is usually more explicit and exact than an English original.

English is language with almost unlimited possibilities of compounding words together. Borders between individual parts of speech are quite relative and especially in technical English compounding makes the text more structural. In Czech, usually more periphrastic and expletive means must be used to achieve the same meaning. In translated text the majority of a technical terminology is created by this way, especially the names of tests and limits. These titles usually take over the names of main subjects involved in the process.

Examples from the text:

- *Rabbit pyrogen test* instead of *Test for pyrogens ran on rabbits*; in Czech translated as *Pyrogenní test na králíciích*.
- *Test sensitivity* instead of *Sensitivity of the test*, translated as *Test citlivosti*
- *Sample intensive* instead of *intensive collection of samples*, translated as *je zapotřebí mnoha vzorků*
- *Validation studies* instead of *studies of validation*, translated as *validační studie*
- *Water for injection system* instead of *System of water used for injection*, translated as *Systém vody na injekce*

¹⁶ See Dagmar Knittlová, *K teorii i praxi překlada*, 156.

- *Dose information* instead of *information about the dose*, translated as *informace o dávkování*
- *Medical device industry* instead of *industry manufacturing the medical device*, and be translated as *průmyslové odvětví zabývající se výrobou zdravotnického zařízení*. Czech version is much more explicit, but also much longer and inconvenient for usage in technical text. It might be better to use *průmysl vyrábějící zdravotnická zařízení*.

Plural of compound nouns is usually made by pluralizing of a last element, such as in case of *validation studies*, but an example of *medical device industry* shows that also the first noun-element can be modified without any problem: *medical devices industry*.

Another lexical item often occurring in the text is an *acronym*. Usually they are explained when appearing for the first time, but some of them had to be found individually from different sources. It is a clear proof of higher level of knowledge expected from recipients of the text. Acronyms used in the documents usually come from English terminology, and they don't change their form in Czech.

They are often repeated in the text, it refers to the typical structure of technical text (stereotyped, repeating) and also to easier application of these short forms in the text. In some cases, it would be exhausting to repeat the phrases in their complete form.

Table of Examples:

Acronym	English term	Czech term
BET	Bacterial Endotoxins Test	test na bakteriální endotoxiny
HBET	Harmonized Bacterial Endotoxins Test	harmonizovaný test na bakteriální endotoxiny
OOS	Out of Specification	výsledky mimo specifikaci
SOPs	Standard Operating Procedures	standardní operační postupy
NCE	New Chemical Entity	nová chemická sloučenina
LRW	LAL Reagent Water	LAL apyrogenní voda

RSE	Reference Standard Endotoxin	referenční standard endotoxinu
CSE	Control Standard Endotoxin	kontrolní standard endotoxinu
EAL	Endotoxin Alert Limit	kritická hladina endotoxinu
API	Active Pharmaceutical Ingredient	léčivá látka; aktivní farmaceutická substance
KTA	Kinetic Turbidimetric Assay	turbidimetrická kinetická metoda

Because of the pharmaceutical scope of the text, also information about amount of drugs is sometimes needed. These are some examples of *formulae and units of measurement* in the text:

- *Lambda* λ – the symbol for LAL reactivity stated in EU/ml. For gel-clot assay, λ is the labeled lysate sensitivity; for kinetic assays it is the lowest point on the endotoxin standard curve.¹⁷
- *Limit (EL) = K (tolerance limit)/M (maximum dose/kg/h)* - The maximum amount of endotoxin allowed in parenteral product or medical device.¹⁸
- *Dalton* - Unit of mass that is used to measure the relative mass of atoms and molecules.¹⁹

¹⁷ James E. Cooper and Cheryl Moses, *Validation procedures for the bacterial endotoxins test* (USA: DHI, 2005), 23.

¹⁸ James E. Cooper and Cheryl Moses, *Validation procedures for the bacterial endotoxins test* (USA: DHI, 2005), 22.

¹⁹ [http://encyclopedia.farlex.com/Dalton+\(unit\)](http://encyclopedia.farlex.com/Dalton+(unit))

CONCLUSION

For an inexperienced translator, the translation of pharmacological texts is a very demanding process. The problem is that the terminology and collocations appearing in the text are not commonly used and even if the translator has the knowledge of equivalent terminology in the target language, it is still relatively difficult to recognize the right usage according to the context. The text *Validation Procedures for the Bacterial Endotoxins Test* is one of those at the borderline of highly specific and specialized literature and journalistic language.

It is a discussion about very specific topic and in the translation analysis a specific qualities of technical text are described. The terminology is highly specialized, with a large portion of compound lexical units – noun groups, which must be translated in more explicit way in Czech. An issue of terminology was further developed in the enclosed lexicon of the terminology. An impartiality of the text is formulated by a frequent usage of passive voice and formal subjects and the sentence structure observes theme and rheme location. It is essential to recognize this sentence structure and to use it properly in Czech translation. However, the flow of the text is more essayistic and journalistic, similar to the style of scientific journals more than to the style of scientific reports, and this fact facilitates the process of translating as well.

BIBLIOGRAPHY

- (U.S.), National Research Council. *Chemical Structure Information Handling: The Subtitle of the Book*. Washington: National Academy of Sciences, 1969.
http://books.google.com/books?id=ApYrAAAAAYAAJ&hl=cs&source=gbs_ViewAPI
- Atwood, Teresa, Peter Campbell, Howard Parish, Tony Smith, John Stirling, and Frank Vella. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Oxford University Press, USA, 2006.
- Baker, Mona. *In Other Words: A Coursebook on Translation*. London and New York: Routledge, 1992.
- Bláha, Karel et al. *Anglicko-Český chemický slovník*. Praha: SNTL Nakladatelství technické literatury, 1988.
- Byrne, Jody. *Usability Strategies for Translating Technical Documentation*. New York: Springer, 2006
- Cooper, James F., and Cheryl Moses. *Validation Procedures for the Bacterial Endotoxin Test*. USA: DHI, 2005.
- Elman, Jiří, and Václav Michalíček. *Anglicko-Český technický slovník*. Praha: Sobotáles, 1992.
- Fogiel, M. *REA's Handbook of English Grammar, Writing & Style (Reference)*. Chicago: Research & Education Association, 1998.
- Greenbaum, Sidney, Geoffrey Leech, Randolph Quirk, and Jan Svartvik. *A Comprehensive Grammar of the English Language*. New York: Longman, 1985.
- Haile, James M. *Technical style: Technical Writing in a Digital Age*. USA: Macatea Production, 2002.
[http://encyclopedia.farlex.com/Dalton+\(unit\)](http://encyclopedia.farlex.com/Dalton+(unit))
- Knittlová, Dagmar. *K teorii i praxi překladu*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003.
- Levý, Jiří. *Umění překladu*. Praha: Panorama, 1983.
- Macpherson, Robin. *Základy Anglické stylistiky*. Praha: Academia, 1997.
- Quirk, Randolph, Sidney Greenbaum, Geoffrey Leech, and Jan Svartvik. *Comprehensive Grammar of the English Language*. New York: Longman Inc., 1985.

APPENDICES

P I Lexicon of Terminology Used in the Text.

P II Validation Procedures for the Bacterial Endotoxins Test.

APPENDIX P I: LEXICON OF TERMINOLOGY USED IN THE TEXT

Active Pharmaceutical Ingredient (API) – Léčivá látka; aktivní farmaceutická substance

Acid – Kyselina

Aggregation – Agregace

Analyst – Zařízení; laborant

Aseptic – Aseptický; sterilní

Bacteria – Bakterie

Bacterial Endotoxins Text (BET) - Test na bakteriální endotoxiny

Bioburden – Bioburden

Buffer – Pufr

Carbohydrate – Karbohydrát

Chelating agent – Chelátové činidlo

Compatibility – Kompatibilita

Concentration – Koncentrace

Contamination – Kontaminace

Depyrogenated – Apyrogenní

Depyrogenation – Depyrogenace

Device – Zařízení

Dilution – Ředění; roztok

Dispersible – Rozpustný

Distillation – Destilace

Divalent cations – Bivalentní kationy

Dose – Množství; dávka

Drug – Léčivo

Drug monographs – Monografie léčiva

Endpoint – Konečný bod; konečný bod

Endotoxin – Endotoxin

Endotoxin Limit – Limit endotoxinu

Enhancement – Enhancement; zvýšení hodnot

Excipient – Pomocná látka

Fermentation – Fermentace

Filtration – Filtrace

Fluid – Tekutina

Formulae – Vzorec

Gel-clot – Gelová sraženina

Gentamicin – Gentamicin

Glucan – Glukan

Gram-negative – Gram-negativní

Harmonized Bacterial Endotoxins Test (HBET) – Harmonizovaný test na bakteriální endotoxiny

Heating – Zahřívání

Hot Spike – Předávkování

“Hot-Spike” method – metoda “hot-spike”

Human drug – Léčivo

Hydrophilic Polysaccharide – Hydrofilní polysacharid

Incubating Microplate – Mikrotitrační destička

Incubation – Inkubace

Infusion – Infúze

Inhibition – Inhibice

Inoculation – Inokulace; očkování

Interference – Rušivý vliv

Intrathecal – Intratekální

Laboratory; Lab – Laboratoř

LAL Reagent Water (LRW) – LAL apyrogenní voda

Limulus Amebocyte Lysate (LAL) – Limulus amebocyte lysate; Limulus amebocytový lyzát

Lipid – Lipid

Macromolecules – Makromolekuly

Medical device – Zdravotnické zařízení

mL – ml

Native Endotoxin – Přírodní endotoxin

New Chemical Entity (NCE) – Nová chemická sloučenina

Out-of-Specification (OOS) – Výsledky mimo specifikaci

Parenteral drug – Parenterální přípravek

Pharmacopoeial monographs – Lékopisné monografie

Potency – Účinnost

Protein – Protein

Purification – Čištění

Pyrogen – Pyrogen

Qualification of Analysts and Reagents – Kvalifikace zařízení a činidel

Rabbit Pyrogen Test – Zkouška na pyrogeny prováděná na králících; Pyrogenní test na králících

Radiopharmaceuticals – Radiofarmaka

Reagent – Činidlo

Recovery – Obnova

Regression analysis – Regresní analýza

Retest – Opakování zkoušky

Revalidation – Revalidace; znovuznání platnosti

Reverse osmosis (RO) – Reverzní osmóza

Rinsing – Promývání

Sample – Vzorek

Sensitivity – Citlivost

Solubility – Rozpustnost

Spike – Dávka

Thermal Incineration – Sterilizace teplem

Denature – Denaturovat

Transfusion – Transfúze

Tube – Zkumavka

Tube reader – Čtečka zkumavek

Ultrafiltration - Ultrafiltrace

Validation – Validace

Veterinary drug – Veterinární léčivo


Water for Injections – Voda na injekce

Water-miscible – Vodou ředitelný

Water-soluble – Rozpustný ve vodě

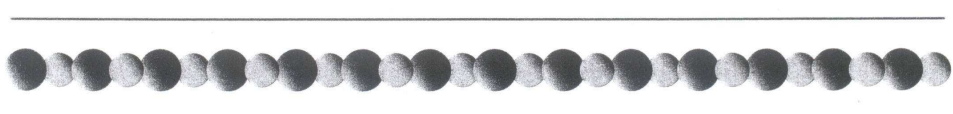
**APPENDIX P II: VALIDATION PROCEDURES FOR THE
BACTERIAL ENDOTOXINS TEST**

Cooper, James F., and Cheryl Moses. *Validation Procedures for the Bacterial Endotoxins Test*. USA: DHI, 2005.



VALIDATION
PROCEDURES
FOR THE
BACTERIAL
ENDOTOXINS
TEST

James F. Cooper
Cheryl Moses



10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ISBN: 1-930114-73-7 Item No. 17226

Copyright © 2005 by James F. Cooper and Cheryl Moses. All rights reserved.

All rights reserved. This book is protected by copyright. No part of it may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without written permission from the publisher. Printed in the United States of America.

Where a product trademark, registration mark, or other protected mark is made in the text, ownership of the mark remains with the lawful owner of the mark. No claim, intentional or otherwise, is made by reference to any such marks in this book.

While every effort has been made by the publishers, editor, and authors to ensure the accuracy of the information contained in this book, this organization accepts no responsibility for errors or omissions.



PDA
3 Bethesda Metro Center
Suite 1500
Bethesda, MD 20814 USA
301-986-0293



Davis Healthcare
International Publishing, LLC
River Grove, IL
USA
405-237-1624

VALIDATION PROCEDURES FOR THE BACTERIAL ENDOTOXINS TEST

James F. Cooper

*Endotoxin Consulting Services,
Greensboro, NC*

Cheryl Moser

*Merck & Co.,
West Point, PA*

INTRODUCTION

Bacterial endotoxin is the most significant pyrogen in the parenteral drug and medical device industries because of its extreme potency and ubiquity in nature. Pyrogen is found on every site or substance where bacterial growth takes place. Bioburden and endotoxin testing are the critical means for assessing control of pyrogens.

The purpose of this discussion is to describe the two types of LAL-test procedures that are used to validate applications of the Bacterial Endotoxins Test (BET) in the parenteral industry. First, there are validation procedures that document the absence of interfering conditions when the BET is used to test and release parenteral drugs or devices. Second, there are validation procedures designed to prove that depyrogenation processes remove or destroy endotoxin to the desired extent. Regulatory and compendial documents that pertain to the control and measurement of endotoxin are reviewed here to identify specific requirements.

BET VALIDATION FOR A DRUG OR DEVICE

LAL-Test Guideline

The FDA's LAL-Test Guideline (FDA, 1987) was the most influential document to emerge during the transition period when *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) reagent began to replace the rabbit pyrogen test. The LAL guideline encouraged the drug industry to take advantage of the new technology by defining specific requirements for rapid conversion to LAL methods. There was early concern about possibly missing non-endotoxin pyrogen with LAL, but firm evidence to support the existence of non-endotoxin pyrogens or materials-mediated pyrogens in parenteral products has not materialized. (Williams, 2001)

The Guideline introduced the concept of the Endotoxin Limit (EL), based on dose, to define a safe level of endotoxin. It also provided formulae for the use of dilution (MVD, maximum valid dilution) or concentration (MVC, minimum valid concentration) to overcome interference mechanisms, and in some cases, reduce the extreme sensitivity of the test. Surprisingly, there was no direct calculation given for test sensitivity. The Guideline has specific sections for testing parenteral drugs and medical devices. The Guideline has three basic requirements: a qualification assay to qualify analysts and reagents, a validation test to assure the absence of interference factors, such as inhibition of gels, and a limit (routine) LAL test to release parenterals with a validated method. These tests required an endotoxin dilution series from 2λ through $\frac{1}{4}\lambda$ to bracket an expected endpoint of the LAL gel reagent and confirm that a test was in control. The limit test required this endpoint CSE series in duplicate to be done with the first set of tests each day. The validation and qualification tests required the endpoint dilution series to be done in quadruplicate.

Although the Guideline is no longer the principal document for LAL testing, procedures in parenteral facilities were written to comply with it. This guide addressed CGMP issues such as sampling, retesting and determination of RSE/CSE ratios that are not found in more recent compendial documents; therefore, it will continue to be referenced. William's text (2001) on endotoxin contains a copy of the original version. The best sources for endotoxin limits are drug monographs and chapters in pharmaceutical compendia.

Harmonized Bacterial Endotoxins Test (HBET)

A Bacterial Endotoxins Test (BET) became effective in January 2001 that contained sweeping changes. (USP, 2002) This revision was adopted by the International Conference on Harmonization. The LAL-Test Guideline and the new BET are now very similar. The new chapter has simplified procedures and describes all LAL methods. The HBET is now the most important document for regulatory compliance in that it is the minimum standard for LAL testing and brings uniformity to the BET, globally. Table 1 compares how certain key issues and requirements are addressed by the two documents.

Validation Procedures for the Bacterial Endotoxins Test

Table 1: Requirements of LAL-Test Guideline and Harmonized BET Compared

Requirement	Comparison and Comment
Plastics	HBET suggests control of interference from plasticware
Endotoxin	Guide allows RSE or CSE; HBET only describes RSE
RSE/CSE determination	Guide allows ratio determination, but it is omitted from HBET
pH of test	Both measure pH of sample/LAL mixture and require neutrality
Validation of LAL method	Guide requires 3 lots; HBET does not specify a number
Revalidation	Required for both if new LAL vendor or new drug formula, but number of lots not specified by HBET
MVD	Calculation is same for both
Endotoxin Limit	Calculation is same for both
MVC	Calculation only appears in Guideline
Label claim, new LAL lot	Both require endotoxin dilution series in quadruplicate *
Label claim, routine test	Guide requires CSE series with first set of daily tests; HBET does not require a CSE series with limit test, only the gel-clot assay
I/E Test for gel-clot	Both documents compare recovery of positive controls
Gel-clot assay (endpoint)	HBET requires CSE series in a quantitative study
Qualification	Only Guideline describes analyst and lab qualification
Retest or OOS	Guide has retest; CGMP requires OOS investigation; not in HBET
LAL reactive glucans	HBET allows testing under endotoxin-specific conditions
Sampling	Guide suggests beginning, middle & end of lot; not found in HBET
Standard curve criteria	Same for both documents; new reagent lot is tested in triplicate
Regression analysis	Guide requires linear regression; type of regression analysis not specified in HBET
PPC recovery in kinetics	Range in guide is 100 ±50 %, but 50-200 % in HBET

Legend: HBET = harmonized BET; I/E = interference/enhancement; OOS = Out-of-specification.

The most important documents for regulatory compliance in a LAL facility are standard operating procedures (SOPs). Ideally, SOPs should undergo annual updates to stay current with the industry. The HBET was expanded to include methods for photometric (kinetic and endpoint) LAL tests, which is clearly the more efficient way to conduct the test.

Some testing issues that a LAL lab may wish to update when converting to the HBET as the principal reference document are:

- control of pyroburden on plastics and depyrogenation of accessories;
- reduction in the frequency of the Control Standard Endotoxin (CSE) dilution series in the gel-clot limit test;
- description of the gel-clot assay when used as a quantitative test;
- tests for LAL reactive glucans, if needed;
- procedure for managing an out-of-specification (OOS) BET result;
- acceptance of Reference Standard Endotoxin (RSE)/CSE ratio determination from the LAL/CSE vendor.

The best way to manage documents in a LAL-test facility is to minimize the number of operating procedures and to make them as comprehensive as possible. Procedures could be limited to:

1. qualification of analysts and reagents;
2. test procedures for all types of finished and in-process products and raw materials;
3. qualification of test samples with respect to interference.

A typical procedure for testing drug products is outlined in Table 2. For medical devices, the procedure would be modified to describe different types of device-extraction protocols. The strategy of a BET procedure for each product is inefficient because document control becomes tedious if a small change in a procedure is needed that impacts on all types of testing.

Table 2: Components of a BET Standard Operating Procedure for Pharmaceuticals

Objective and Scope of the Procedure

Responsibility for writing and maintaining the document

Reference documents, including regulations, compendia, related SOPs and forms

Definitions of terms associated with the BET

Materials and equipment

Prerequisites stating the need for qualified analysts and reagents

Procedures for the BET to include:

Preparation and storage of control endotoxin standards (CSE)

Rehydration and storage of LAL reagents

Preparation of water samples and other non-interfering products for testing

Preparation of interfering finished products for testing by validated methods

Preparation of in-process products for testing by validated methods, if applicable

Inoculation, incubation and reading of results of test samples by gel-clot methods

Inoculation, incubation and reading of results of test samples by kinetic LAL methods

Interpretation of results and conditions for validity of the sample and the test

Management of Out-of-Specification results

Rather, it is best to include a table in the section for describing how individual products should be diluted or treated prior to conducting the BET.

Validation of a BET Method for a New Chemical Entity (NCE)

BET method validation is designed to document that a BET procedure will detect endotoxin in a specific drug formula or device extract without interference. Sound science and good documentation are the keys to a successful validation project. BET validation for a new chemical entity (NCE) serves as a means for discussing representative validation steps that are needed to bring a new parenteral to the marketplace.

The LAL test is reasonably rugged and free of interference, such as enhancement and inhibition. Generally, little or no interference occurs if a test material is pH neutral, highly soluble in water, contains minimal chelating agents for divalent cations and contains salts or solutes in low concentrations. The process of validation begins when a NCE is presented to a laboratory for endotoxin testing. BET validation for a new product requires progressive steps, beginning with a bulk NCE and ending with the finished drug formulation. Validation may also be needed for vital in-process steps and critical excipients. Preliminary information from drug developers is needed to expedite validation by the BET lab:

- preliminary dose estimate relative to an endotoxin limit;
- solubility data for water and water-miscible organic solvents;
- information on the origin of the material (natural versus synthetic source);
- precautions needed for an analyst to work with a material.

Endotoxin Limit

It may be impossible to render materials absolutely pyrogen free because endotoxin is stable, highly potent and ubiquitous in nature. Therefore, an endotoxin limit (EL) represents the maximum safe amount of endotoxin that is allowed in a dose of a specific parenteral product. The tolerance limit in the K/M formula varies with the type of product and route of administration, as summarized in Table 3. For example, development of aseptic meningitis in patients receiving intrathecal medications led to stringent limits for drugs administered by this route. (Cooper and Harbert, 1975) A product-specific endotoxin limit is found in pharmacopoeial monographs for established drugs. The EL for a new entity is determined by this dose-related formula:

$$\text{Endotoxin Limit (EL)} = \frac{K \text{ (tolerance limit)}}{M \text{ (maximum dose/kg/h)}}$$

Dosage information may be unavailable during early development of a NCE. Since there is a trend toward higher potency drugs, a preliminary endotoxin limit of 1 EU/mg will suffice until the drug is prepared for clinical studies. The extent of dilution to resolve interference is limited by the MVD or MVC. The MVC is the concentration of a NCE when it is diluted to its permissible extent allowable (MVD) under specified test conditions for sensitivity and dilution. The MVC is more

Table 3: Endotoxin Tolerance or Allowable Limit by Parenteral Product

Parenteral Type	Endotoxin Tolerance Limit (K)
Human or Veterinary Drugs and Biologics	5 EU/kg
Parenterals by intrathecal injection	0.2 EU/kg
Radiopharmaceuticals	175 EU/V ⁺
Intrathecal radiopharmaceuticals	14 EU/V ⁺
Large volume parenterals	0.5 EU/mL
Water for Injection	0.25 EU/mL
Medical devices by extraction	0.5 EU/mL up to 20 EU/device
Medical devices in intrathecal spaces	0.06 EU/mL up to 2.15 EU/device
Multiple ingredient small-volume parenteral	70 EU/V ⁺⁺
New chemical entity, preliminary	1 EU/mg* until human dose is known

⁺ Maximum dose in volume (mL). * Recommended limit by the authors, not pharmacopoeia.

applicable here because the NCE is usually presented as a powder that must be weighed and dissolved prior to testing.

Solubility

The BET is an aqueous test system. The solubility data for a NCE in water and common water-miscible solvents is necessary, particularly when the NCE is poorly soluble in water. It is often useful to dissolve a NCE in a mixture of water and solvent, and then dilute to a concentration where it is both soluble and LAL-compatible. For example, LAL reagent will tolerate a 5 % (v/v) ethanol in water and a 1 % (v/v) water/DMSO (dimethylsulfoxide) mixture. It may be useful to dissolve a material in an inorganic or organic acid or base in order to form water-soluble salts. In this case, a low molarity reagent avoids neutralization of an extreme pH range and potential reduction of native endotoxin. Knowledge of the origin of a material helps explain endotoxin values that may be observed. If the NCE was developed under conditions that would support bacterial growth, bioburden and pyroburden data are indicated. Recombinant drugs developed from a fermentation process may have a high endotoxin concentration, and requires endotoxin monitoring during purification processes. Biologicals may contain enzymes that must be denatured by heat treatment.

Compatibility Profile by Gel Clot and Kinetic LAL Methods

Dilution of a test material with LAL Reagent Water (LRW) is the ideal way to overcome interference. As indicated in the BET, a treatment of a test material to overcome inhibition, such as filtration or heating, needs evidence through validation to show that the modification would not underestimate any native endotoxin that might be present in a test material.

The preferred approach to determine LAL compatibility with a NCE is to study the recovery of endotoxin with decreasing concentrations of a test material. In the test for interfering factors, a series of dilutions of the NCE are prepared in sterile polystyrene tubes or depyrogenated glass for LAL testing to identify a LAL compatible range of concentration, defined as one that allows recovery of an endotoxin Positive Product Control (PPC). For highly soluble materials, it is useful to prepare two-fold (1:2) dilutions made with LAL Reagent Water (LRW) and conduct recovery experiments over a range of 8 to 0.1 mg/mL. Other ranges may be more suitable for a material because of greater solubility or dose estimates. Less soluble or more potent materials may be studied in a similar manner at a level of 1 mg/mL and below, or from a point of greatest solubility in water. Ideally a compatible concentration is identified using a gel-clot method and confirmed by a kinetic turbidimetric analysis (KTA). The supplies, reagents and human resources required to complete a BET validation are substantial. It is cost-effective to validate multiple LAL methods and vendors simultaneously because the cost and effort of sample preparation and documentation is about the same for two methods as for one. Some regulatory agencies wish to see gel-clot as well as kinetic LAL data for NCE validation.

One lot of a NCE is sufficient for an interference screening study by both gel-clot and KTA methods. Table 4 exemplifies a LAL compatibility and pH profile for a synthetic antibiotic that was dissolved with a minimum volume of dilute sulfuric acid solution, to form a sulfate salt, and diluted to 8 mg/mL. Dilutions of the product in LRW were prepared from 8 to 0.1 mg/mL. All of the dilutions made with LRW were negative, indicating that there was no evidence of endotoxin in the sample at a level of 1 mg/mL, the first valid PPC recovery. At 1 mg/mL, the gel-clot reagent was positive, but the KTA recovered the PPC consistently at 0.5 mg/mL and below. The latter concentration was proposed for further validation studies. The term non-inhibitory concentration (NIC) is deceiving because the highest concentration to recover a 2 λ PPC in a gel-clot study may be achieved by only 50 % recovery.

Table 4: Compatibility Profile for a Sulfate Salt of a Synthetic antibiotic by Gel Clot and KTA

LRW (LAL Reagent Water) was used to prepare product dilutions. PPC (Positive Product Control) in gel-clot prepared by 10 μL of 20-λ CSE spike. PPC in KTA (kinetic turbidimetric assay) spiked at midpoint of a 5 to 0.05 EU/mL standard curve.

Potency (mg/mL)	8	4	2	1	0.5	0.25	0.1
LRW/NCE Gel Study	--	--	--	--	--	--	--
2λ PPC Recovery	--	--	+	++	++	++	++
% PPC Recovery	22	52	69	89	103	98	
LAL/Sample pH	5.8	6.1	6.5	6.8	6.9	6.9	6.9

A compatibility screening or sample-qualification study can be done by diluting one set of tubes with LRW and the other with a 2λ solution. However, the 'hot spike' method was used to prepare each PPC. For maximum efficiency, the study was conducted by making one set of product dilutions with LRW, inoculating four assay tubes with each product concentration, and finally, adding $10\ \mu\text{L}$ of a $20\text{-}\lambda$ spike to two PPC tubes in each set. A recovery of at least 75 % is needed for kinetic LAL studies to assure that a reproducible, non-interfering test concentration is selected for sample validation experiments.

Effect of pH

The FDA expects a pH profile because of its impact on inhibition. If a test material (sample and LAL mixture) is not neutral, one is expected to show that the most extreme pH of a specification is non-interfering. For example, if the pH specification for a product is 4 to 6, experiments must show that when the product is adjusted to pH 4, the validated method will yield a neutral mixture of the diluted product and LAL reagent.

A LAL-compatibility and pH profile documents how efficiently dilution resolves inhibition and how gel-clot and kinetic methods compare in sensitivity. The profile can also identify glucan contamination if PPC recoveries in the kinetic study are greatly enhanced. (Cooper et al., 1997) The pH of a test solution is critical, particularly in kinetic LAL studies. Ideally, the pH of the standards and the samples must be within 0.1 pH units for best recovery of endotoxin controls. Piluso (1999) demonstrated the power of compatibility profiles in validating a BET method for liposomes.

A life-cycle approach to BET product validation requires sample qualification at various stages of manufacturing. The development of the final formulation may increase or ease inhibitory conditions. For example, the combination of the API with excipients, preservatives and buffers may significantly alter the compatibility profile of a new product. The final-product BET method validation may yield a procedure that is quite different from the API.

Test Sensitivity

The sensitivity of the LAL-compatible concentration (LAL-CC) must be compared with the endotoxin limit to determine if test conditions are sufficiently sensitive. In the absence of dose information, an endotoxin limit was arbitrarily assigned at 1 EU/mg for the antibiotic in Table 4. At 0.5 mg/mL, LAL methods were sufficiently sensitive to meet the preliminary limit. Test sensitivity at the LAL-CC of 0.5 mg/mL was 0.1 EU/mg for the KTA method and 0.125 EU/mg for gel-clot, where sensitivity is λ divided by the test concentration (TC). Significant inhibition creates the need for more sensitive methodology.

Product Specific Sensitivity (PSS) for KTA = 0.05 EU/mL/0.5 mg/mL
 = 0.1 EU/mg

Endotoxin Alert Level (EAL)

An EAL is an internal specification for an API that is 4-to-5 times more stringent than the endotoxin limit for the final product. The value of an EAL for an API became evident following a cluster of pyrogenic reactions (1998-9) that were caused by contaminated bulk gentamicin. (Fanning, 2000) Many reactions were associated with levels of endotoxin that were equal to or less than the limit. An EAL representing a 25% reduction on the final-product limit is prudent for drugs that are produced by fermentation or recombinant technology, filled by aseptic processing and intended for IV or intrathecal administration.

Case Study

The results of BET validation experiments on a problematic NCE are summarized in Table 5. A conservative, preliminary endotoxin limit was assigned to NCE with aqueous solubility of 2.5 mg/mL. A routine LAL-compatibility and pH screen was conducted with gel-clot (GC) and KTA reagents. Solubility limited the compatibility screen from 2 to 0.05 mg/mL. Full recovery of PPCs was found at 0.25 mg/mL, the compatible concentration (CC), but the sensitivity under the conditions specified (PPS, product specific sensitivity) was very close to the endotoxin limit concentration. A margin of safety (ratio of the EL to the test sensitivity) of at least 4 is preferred, so a more sensitive test was indicated to yield a greater margin. A KTA standard curve of 1 to 0.01 EU/mL was selected as the best option for greater sensitivity. An endotoxin alert level was assigned at 0.1 EU/mg for the bulk drug or API.

Table 5: Summary of Validation Studies for a NCE with Gel-Clot and KTA Methods

GC is gel clot and KTA is kinetic turbidimetric analysis. MVC is minimum valid concentration

Preliminary Endotoxin Limit	0.4 EU/mg based on 12 mg/kg/dose IV
Solubility	2.5 mg/mL
LAL Reagent Sensitivity	GC @ 0.06 EU/mL and KTA @ 0.05 EU/mL
MVC found by λ /EL	GC @ 0.15 mg/mL and KTA @ 0.125 mg/mL
MVD	Not applicable for bulk powder
LAL Compatible Concentration (CC)	0.25 mg/mL for GC and KTA
pH of a LAL/NCE @ mixture @ the CC	6.9 versus 7.0 for a LRW/LAL mixture
Sensitivity (PSS = λ /CC) at λ values above	0.25 EU/mg for GC, 0.2 EU/mg for KTA
Margin of Safety (MS = EL/PSS)	1.6 for GC and 2 for KTA
Sensitivity at 0.01 EU/mL for KTA	0.04 EU/mg
Margin of Safety for more sensitive study	10 when low standard in KTA = 0.01 EU/mL
Endotoxin alert level	0.1 EU/mg assigned by QA/RA

BET Validation Report

A comprehensive validation report addresses all issues that impact on test reliability and regulatory compliance. Table 6 exemplifies a summary of the 3-lot validation for PPC recovery and pH neutrality. The report should include the following:

- detailed description of materials, equipment, software and methods;
- calculations such as endotoxin limits, endotoxin alert levels and test sensitivity;
- experimental findings and significant problems that were solved;
- description of the sample preparation and assessment of reproducibility;
- conclusion that the validated method is non-interfering and pH neutral.

Table 6: Summary of Endotoxin Recovery and pH Measurement Studies

Lot	PWC	Gel-Clot LAL		Kinetic LAL	
		PPC	pH	Recovery (%)	pH
A	0.0625	0.031	6.9	114	6.9
B	0.031	0.031	7.0	88	7.0
C	0.0625	0.037	7.0	96	7.0

PWC: positive water control; PPC: positive product control; pH: hydrogen ion concentration,

Prior to adoption of the harmonized version of the BET, there was uncertainty concerning whether or not kinetic LAL methods were subject to the USP chapter <1225> regarding validation of compendial methods. However, the new BET specifically describes all photometric or kinetic LAL methods and conditions. The compendial method provides the required specified specifications for accuracy and reliability.

Medical devices

BET validation for devices was not emphasized here because devices seldom produce extracts that inhibit or enhance a BET. The most critical validation experiment is development of an extraction procedure that fully evaluates the fluid pathway of a device. An endotoxin challenge and recovery from a device is not required because the FDA concluded that such extractions were inefficient. The Background section to the FDA's LAL-test guideline indicates that a stringent endotoxin limit equivalent to 20 EU/device was assigned because of the surmised incomplete removal of endotoxin during routine LAL testing. (FDA, 1987)

VALIDATION OF DEPYROGENATION PROCESSES BY BET METHODS

The FDA guide and harmonized BET are written for release testing of parenterals. However, end-product assessment constitutes a relatively small proportion of the LAL tests done in most parenteral facilities. Most of the tests are applied to in-process

Table 7: References to Pyrogen Test or Bacterial Endotoxins Test in USP 25-NF 20

General Chapters		Summary of Requirements
<1>	Injections	Vehicles for aqueous Injections meet requirements of Pyrogen Test or BET
<11>	USP Reference Standards	Use and storage of USP Endotoxin RS
<85>	Bacterial Endotoxins Test	Harmonized BET with all LAL methods; procedures and interpretation
<151>	Pyrogen Test	Procedure and materials for a rabbit pyrogen test
<161>	Transfusion and Infusion Assemblies & Similar Medical Devices	Scope of test; procedure for extracting medical devices; limit of 20 EU per device
<823>	Radiopharmaceuticals for PET-Compounding	In-process and release test instructions for short-lived radiopharmaceuticals
<1041>	Biologics	Pyrogen Test and BET for blood products
<1045>	Biotech.-Derived Articles	Endotoxin detected by the BET or Pyrogen-Test
<1078>	Manufacturing Practices for Bulk Pharmaceutical Excipients	Manufacturer of an excipient ensures freedom from pyrogens, if claimed in specifications
<1211>	Sterilization and Sterility Assurance of Comp. Articles	A 1,000-fold reduction of a known amount of endotoxin challenge as part of oven validation
<1231>	Water for Pharmaceutical Purposes	Criteria for selecting pharmaceutical waters; 0.25 EU/mL limit for WFI; none for in-process water

monitoring of water and starting materials, such as APIs, excipients, buffers and components, to assure that the final product is endotoxin free. Table 7 summarizes the references to endotoxin and pyrogen testing that appears in the current USP. (USP, 2002) The USP does not specify how the BET should be modified for tests such as validating the depyrogenation of components for aseptic processing. It is prudent to treat tests used for water and in aseptic processing as a USP limit test and to apply equivalent criteria for test validity.

Methods of Depyrogenation

Endotoxin has good thermal stability and is difficult to destroy chemically. The means used to eliminate endotoxin are usually expensive. Depyrogenation refers to any process that is designed to remove or destroy endotoxin. Depyrogenation is accomplished by separation techniques such as distillation or ultrafiltration, peroxide oxidation, rinsing and thermal incineration. All depyrogenation processes require a BET method for process validation.

A brief review of endotoxin helps explain how depyrogenation is accomplished.

Environmental (unpurified) endotoxins contain lipid, carbohydrate and protein, and have a common structure of a hydrophilic polysaccharide covalently bound to a hydrophobic region known as Lipid A. Whereas the polysaccharide region is highly variable among the various gram-negative bacterial families, the Lipid A region of the molecule is remarkably uniform in structure, pharmacological activity, and capacity for LAL activation. Endotoxins are negatively-charged macromolecules as small as 20-to-30 thousand daltons up to 10⁶ daltons, varying in size due to bacterial origin and the presence of divalent cations or biological detergents. The large polysaccharide portion of endotoxin renders it quite dispersible in water and easily rinsed away from most materials. Purified endotoxin, used in validation studies, is less dispersible than naturally occurring endotoxin because it does not have protein bound to it. Therefore, use of purified endotoxin represents a worst-case scenario for endotoxin recovery studies because it is more difficult to rinse away and is prone to aggregation, which introduces recovery artifacts.

Validation of a Water for Injection (WFI) System

Distillation was the first process developed for depyrogenating water. Ultrafiltration, distillation and reverse osmosis (RO) efficiently separate endotoxin from water because of its molecular size. Modern-day water systems usually combine distillation and RO in water treatment. The validation of a new WFI system is long and sample intensive. (Meltzer, 1995) It is unrealistic to think of validating a new system without the aid of a kinetic LAL method, supported by an incubating microplate or tube reader with endotoxin-specific software. Software is available for collection and analysis of data as well as storing observations for subsequent trend analysis. (Cooper, 2001)

The FDA expects intensive bioburden and endotoxin testing during validation of a new water system. For one month during the latter part of Installation Qualification, it is prudent to take water samples from up-stream sites (feed water, RO units, resin beds, tanks, etc.) as well as each point-of-use in a WFI loop. For example, daily samples are taken for an additional 4-to-6 weeks during Operational Qualification at which time the adequacy of procedures and systems are documented. Afterwards, the frequency of sampling of each point may be reduced to weekly for the WFI loop and monthly or greater for other, less critical sites. That is, not every point is tested daily, but drop points in the WFI loop may be alternated during the Performance Qualification where the influence of seasonal variables is evaluated. The principal source of endotoxin is not the feed water but development of biofilm in the system or bacterial colonization in resin beds and other sites where microbes are trapped.

The range of the kinetic BET standard curve or sensitivity of a gel-clot reagent should be selected before validation begins. A range of 5-to-0.05 or 10-to-0.01 EU/mL in a kinetic turbidimetric assay (KTA) is convenient and sufficiently wide to measure

samples from most upstream sites without dilution. It is common to see 0.1 EU/mL as the action level and 0.05 EU/mL as the alert level for drop points in the WFI loop. No endotoxin or cfu limits are indicated for other sample sites because the only interest here is to identify endotoxin levels that differ from historical data so that an appropriate preventive intervention can be made, if applicable. For example, if historical data showed that levels in the mixed resin bed did not exceed 0.1 EU/mL, and observed levels crept well above 1 EU/mL, there might be a need to recharge the resin beds.

Another concern is a test for interfering factors related to the LAL test. Water is not inhibitory, but the water-collection container may provide a source of inhibition. Certain plasticware is reported to absorb endotoxin or release powerful inhibitors into the test sample. Therefore, it is critical to make the choice of at least two containers a part of the validation exercise. New heat-resistant, inert and non-breakable plasticware is available as an alternative to depyrogenated glass containers. The other source of interference in kinetic LAL systems is an enhancement artifact caused by non-linearity in the standard curve.

The success of a validation study is largely dependent on how orderly data is kept and managed as well as methods for collecting it. The application of kinetic LAL and trend-analysis software provides the opportunity to set up a robust system for collection and management of endotoxin data. Figure 1 depicts the setup of a template for monitoring a WFI system with a KTA method that could be used for the duration of a validation project. To initiate a study each day, the template would be recalled and lot numbers entered for each site. The lot number is often the collection date. After the period of daily collection has passed, the template could be modified to account for reduced testing, but the product name or identify of the drop site would be kept to facilitate trend analysis.