

# Limulus-Amöbozyten-Lysat

## CHROMO-LAL

Hergestellt von:	Telefon:	(508) 540-3444
	Gebührenfrei:	(888) 395-2221
	Fax:	(508) 540-8680
124 Bernard E. Saint John Drive • E. Falmouth, MA 02536-USA	Technischer Kundendienst:	(800) 848-3248
	Kundendienst:	(800) 525-8378
US-Lizenz-Nr. 700	PN001087-de rev5	Okt. 2019

### LIMULUS-AMÖBOZYTEN-LYSAT CHROMO-LAL

zum Nachweis und zur Quantifizierung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (Lipopolysacchariden)

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS

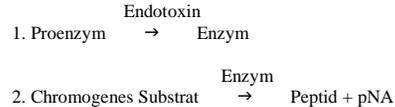
In den 1950er Jahren beobachtete Frederik Bang, dass Infektionen durch gramnegative Bakterien bei *Limulus polyphemus*, dem Pfeilschwanzkrebs, zu einer intravaskulären Koagulation führten (1). Levin und Bang wiesen nach, dass die Koagulation durch die Aktivierung einer Reihe von Enzymen in den Blutzellen (Amöbozyten) von *Limulus polyphemus* hervorgerufen wurde und dass diese Aktivierung vom Endotoxin (Lipopolysaccharid) in der Zellwand der gramnegativen Bakterien ausgelöst wurde (2, 3, 4). Der chromogene Test, der 1977 eingeführt wurde (5, 6), ist eine Modifikation, mit dem die Endotoxinkonzentration nun anhand der Farbintensität und nicht mehr aufgrund der Trübung oder Gelbfärbung im Reaktionsgemisch gemessen werden kann. Die mittels dieser modifizierten Methode erhaltenen Ergebnisse sind im Allgemeinen vergleichbar mit den Ergebnissen der Festgel- oder turbidimetrischen Methode und liegen in derselben Fehlerbreite.

Beim Chromo-LAL-Test werden co-lyophilisiertes LAL und Substratreagenz im Verhältnis 1:1 mit der Testprobe in einer Mikrotiterplatte oder Ähnlichem vermischt und in einem Lesegerät bei  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Absorptionsmessungen werden mit der Zeit nach Zugabe von Chromo-LAL erfasst und mithilfe einer geeigneten Software analysiert. Anschließend wird berechnet, wie lange eine Probe bis zum Erreichen einer festgelegten Absorption (Anfangs-OD) benötigt (Anfangszeit), und eine Standardkurve, die die lineare Korrelation zwischen der Log-Anfangszeit und der Log-Konzentration von Standard-Endotoxin zeigt, wird generiert. Der maximale Bereich von Endotoxinkonzentrationen für die Standardkurve beträgt 0,005 EE/mL–50 EE/mL. Die Sensitivität ( $\lambda$ ) des Assays ist als niedrigste, in der Standardkurve verwendete Konzentration definiert. Die maximale Sensitivität dieses Tests beträgt 0,005 EE/mL.

### BIOLOGISCHES PRINZIP

LAL enthält Enzyme, die in Gegenwart von Endotoxin in einer Reihe von Reaktionen aktiviert werden. Das letzte, in der Kaskade aktivierte Enzym spaltet das Chromophor

para-Nitroanilin (pNA) vom chromogenen Substrat ab, was zu einer Gelbfärbung führt.



Die Menge an freigesetztem und photometrisch bei 405 nm gemessenem pNA ist proportional zur Menge des Endotoxins im System. Je höher die Endotoxinkonzentration, desto schneller die Reaktion.

### REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien sind bei  $2^\circ\text{C}$ – $8^\circ\text{C}$  bis zum auf dem Behälteretikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Reagenzien vor der Rekonstitution auf Raumtemperatur bringen und die Fläschchen mit gefriergetrocknetem Material gegen eine harte Oberfläche klopfen, damit loses Material zum Boden des Fläschchens rieselt.

- 1. Chromo-LAL, Limulus-Amöbozyten-Lysat, mit chromogenem Substrat co-lyophilisiert**  
Dieses Reagenz ist ein wässriger Extrakt von Amöbozyten des *L. polyphemus*, gepuffert mit einem pH-Wert von 7 und co-lyophilisiert mit dem chromogenen Substrat. Chromo-LAL unmittelbar vor Gebrauch mit 3,2 mL LAL-Reagenzwasser (LRW) rekonstituieren. Diese Lösung ist 24 Stunden lang bei einer Temperatur von  $2^\circ\text{C}$ – $8^\circ\text{C}$  oder zwei Wochen lang bei einer Temperatur von höchstens  $-20^\circ\text{C}$ , sofern sie unmittelbar nach der Rekonstitution eingefroren und nicht kontaminiert wurde, stabil. Chromo-LAL darf einmal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Eine Kontamination äußert sich eventuell in einer dunkelgelben Färbung, die sich rasch nach der Rekonstitution entwickelt. Unter normalen Anwendungsbedingungen verfärbt sich das Reagenz langsam gelb.
- 2. Endotoxin-Standard**  
Kontroll-Standard-Endotoxin (KSE) gehört nicht zum Lieferumfang von Chromo-LAL und ist separat zu bestellen. KSE, zu beziehen von Associates of Cape Cod, Inc., wird verwendet, um Standardkurven zu erstellen, Produkte zu validieren und Hemmungskontrollen anzusetzen. Jedes Fläschchen enthält ein abgemessenes Endotoxingewicht. Alternativ kann der USP Endotoxin-Referenzstandard verwendet werden. Für die Rekonstitution und Lagerung von Standardendotoxinen sind die Herstelleranweisungen zu befolgen. KSE-Chargen weisen beim Test mit verschiedenen Chargen Chromo-LAL eventuell unterschiedliche Potenzen (EE/ng) auf. Bei der Verwendung von KSE können Endotoxinkonzentrationen in EE/mL angegeben werden, wenn die Potenz einer bestimmten Charge KSE mit der entsprechenden Chromo-LAL-Charge bestimmt wurde (10,11).

- 3. LAL-Reagenzwasser (LRW)**  
LRW ist steriles, durch Destillation oder Umkehrosmose hergestelltes Wasser, das im Test mit Chromo-LAL kein nachweisbares Endotoxin aufweist.

Weitere Fläschchen mit LRW können von Associates of Cape Cod, Inc. bezogen werden.

**Vorsichtinweise und Warnungen:** Chromo-LAL dient nur zur *In-vitro*-Diagnostik. Diese Reagenzien nicht zum Nachweis einer Endotoxämie verwenden. Beim Umgang mit Chromo-LAL-Reagenz ist Vorsicht geboten, da seine Toxizität nicht bestimmt worden ist und Berichte über Allergien gegenüber LAL vorliegen (7). Aseptische Techniken sind anzuwenden. Alle Materialien, die in Kontakt mit Proben oder Reagenzien kommen, müssen frei von nachweisbarem Endotoxin sein. Wärmestabile Materialien, einschließlich sauberer Glasartikel, können von nachweisbarem Endotoxin befreit werden, indem sie mindestens 30 Minuten lang trockener Wärme bei einer Temperatur von mindestens  $250^\circ\text{C}$  ausgesetzt werden (8).

### PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Proben so entnehmen, dass eine mikrobielle Kontamination vermieden wird. Im Umgang mit Proben und Reagenzien aseptische Techniken anwenden. Alle Proben möglichst bald nach Entnahme testen oder bei  $2^\circ\text{C}$ – $8^\circ\text{C}$  lagern. Ist ein Bakterienwachstum zu erwarten, können die Proben eingefroren werden. Sicherstellen, dass die Lagerung den Gehalt an nachweisbarem Endotoxin in der Probe nicht senkt (Endotoxin kann an die Behälteroberfläche adsorbieren). Viele Substanzen stören den Chromo-LAL-Test. Eine Störung zeigt sich in Form einer Hemmung, also der Wiederfindung einer gegenüber dem erwarteten Wert geringeren Endotoxinmenge in einer Probe, oder in Form einer Verstärkung, also der Wiederfindung einer gegenüber dem erwarteten Wert höheren Endotoxinmenge in der Probe (Nachweis einer Störung siehe „Verfahren“). Eine Störung wird im Allgemeinen durch Verdünnen der Probe mit LAL-Reagenzwasser beseitigt. Nicht über die maximal gültige Verdünnung (mgV) hinaus verdünnen (9, 10, 11, 12).

$$\text{mgV} = \frac{\text{Endotoxin-Grenzwert} \times \text{Produktkonzentration}}{\lambda}$$

Bestimmte Verbindungen benötigen eventuell neben der Verdünnung eine Sonderbehandlung, um Störungen zu beseitigen. Beispielsweise können Blutprodukte, die aktivierte Enzyme enthalten, falsch-positive Ergebnisse verursachen. Diese Probenarten können mit LAL-Reagenzwasser verdünnt und über einen angegebenen Zeitraum bei einer Temperatur von mindestens  $75^\circ\text{C}$  erhitzt werden, um Störungen ohne Verlust der Endotoxin-Aktivität zu eliminieren. Proben, die bei 405 nm stark absorbieren, können den Test stören und müssen eventuell zuvor verdünnt werden.

### TESTVERFAHREN

**Erforderliche Geräte und Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind:**

1. Teströhrchen, Mikrotiterplatten oder Ähnliches, frei von nachweisbarem Endotoxin. Von nachweisbarem Endotoxin freie Teströhrchen und Mikrotiterplatten können über Associates of Cape Cod, Inc. bezogen werden.
2. Pipetten und Pipettenspitzen, frei von nachweisbarem Endotoxin. Über Associates of Cape Cod, Inc. zu beziehen.

3. Repeaterpipetten mit Dosierspritzen, frei von nachweisbarem Endotoxin.
4. Vortex-Mixer.
5. Parafilm M<sup>®</sup>. Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist normalerweise nicht-pyrogen.
6. Optisches Lesegerät, ausgestattet mit geeigneter Software, das eine gleichmäßige Temperatur von  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  aufrechterhalten kann.
7. Kinetische Software. Software, die bei Bedarf auch in kurzen Abständen Messwerte für die optische Dichte (OD) erfasst und speichert. Zudem muss die Software die „Anfangszeit“ für die Probe in jeder Kavität berechnen. Unter der Anfangszeit versteht man die Zeit, bis die OD in einer bestimmten Kavität einen bestimmten OD-Wert (Anfangs-OD) erreicht hat. Der gewählte Wert für einen in einer Mikrotiterplatte durchgeführten Test kann zwischen 0,03 und 0,2 OD-Einheiten liegen; für Routinetests sollte jedoch derselbe Wert verwendet werden, der für die Validierung des Assays für das betreffende Produkt verwendet wurde.

Die Software sollte die Standardkurvenparameter (Steigung, Achsenabschnitt und Korrelationskoeffizient) generieren und die Endotoxinkonzentrationen in den unbekanntenen Proben berechnen. Die Software kann zusätzliche Berechnungen wie die Berechnung der Konzentration des Endotoxins, das in der positiven Produktkontrolle wiedergefunden wurde, nach Abzug ggf. in der Probe vorhandenem endogenen Endotoxins durchführen.

### Standardkurve

Bei der Erstellung einer Standardkurve soll in jedem Satz Testproben eine Standardkurve, die aus mindestens drei Endotoxinkonzentrationen besteht, in zweifacher Ausführung mitgeführt werden. Zusätzliche Konzentrationen sollten so hinzugefügt werden, dass mindestens ein Standard pro Log-Stufe des Bereichs vorhanden ist (10). Die Standard-Endotoxin-Konzentrationen mithilfe von Reihenverdünnungen beginnend mit der höchsten oder „Stamm“-Konzentration ansetzen. Die Stamm-Konzentration vor dem ersten Transfer etwa 30 Sekunden lang mit einem Vortex-Mixer mischen.

Zum Ansetzen von Standard-Endotoxinen können alle Verdünnungsschemata verwendet werden und die Konzentrationen, die zur Erstellung der Kurve verwendet werden, können alle Bereiche innerhalb der Grenzwerte 0,005 EE/mL bzw. 50 EE/mL umfassen. Die niedrigste Konzentration in der Kurve ist die Sensitivität ( $\lambda$ ) des Assays.

Ein Beispiel für das Ansetzen einer breitgefassten Reihe, bei der  $\lambda$  gleich 0,005 EE/mL ist, ist in der Tabelle unten dargestellt.

Standardkonzentrationen EE/mL	LAL-Reagenz wasser (µL)	Endotoxin-Standard-Lösung
50	950	50 µL der Stammlösung
5	900	100 µL der 50-EE/mL-Lösung
0,5	900	100 µL der 5-EE/mL-Lösung
0,05	900	100 µL der 0,5-EE/mL-Lösung
0,005	900	100 µL der 0,05-EE/mL-Lösung
Neg.-Kontr.	1000	

Eine archivierte Standardkurve (10) wird nicht empfohlen. Die Parameter der Kurve verändern sich im Laufe der Zeit nach der Rekonstitution des Reagenz. Daher sollten Endotoxin-Standard-Konzentrationen in jedem Test mitgeführt werden.

#### Negativkontrolle

Negativkontrollen sollten in zweifacher Ausführung bei jedem Probensatz mitgeführt werden. Die Negativkontrolle ist das LRW, das zur Verdünnung der Proben für den Test verwendet wurde. Die Anfangszeit der Negativkontrolle sollte mindestens 10 % länger sein als die des Standards mit der niedrigsten Konzentration. Sobald die charakteristische Leistung der Negativkontrolle bekannt ist, kann der Prüfer den Assay anhalten, auch bevor die voreingestellte Laufzeit abgelaufen ist (siehe „Durchführungsdauer des Assays“ unten). Den Assay nur anhalten, wenn nach Sichtprüfung aus der Reaktionskinetik geschlossen werden kann, dass die niedrigste Konzentration des Standards die Anfangs-OD erreicht hat und dass die OD der Negativkontrolle charakteristisch niedrig ist.

#### Nachweis von Störungen

Eine Probe, der eine bekannte Menge von Endotoxin-Standard zugegeben wurde (gespikete Probe), wird als positive Produktkontrolle bezeichnet. Diese Kontrolle für den Nachweis einer Hemmung oder Verstärkung ist in Routine-Testprotokollen enthalten. Durch den Vergleich der Wiederfindung der Endotoxinkonzentration in der positiven Produktkontrolle mit der bekannten zugegebenen Konzentration kann bestimmt werden, ob die Probe den Assay hemmt (es wird weniger Endotoxin nachgewiesen als vorhanden ist) oder verstärkt (es wird mehr Endotoxin nachgewiesen als vorhanden ist).

Die berechnete mittlere Konzentration des zugegebenen Endotoxins (Konzentration in der gespikten Probe minus Konzentration in der Probe) muss zwischen 50 % und 200 % der erwarteten Spikekonzentration liegen, um zu zeigen, dass das Produkt den Assay weder hemmt noch verstärkt.

Die für den Spike gewählte Konzentration ist abhängig vom Bereich der Standardkurve und vom Endotoxin-Grenzwert für die Verdünnung oder Konzentration der getesteten Probe (Pass/Fail-Cutoff, 10).

Die Spikekonzentration sollte eine der in der Standardkurve verwendeten Konzentrationen sein und in etwa in die Mitte des Standardbereichs fallen. Für die oben abgebildete breitgefaste Kurve und bei Proben, die einen Pass/Fail-Cutoff kleiner oder gleich 1 EE/mL haben, kann eine Endotoxinkonzentration von 0,5 gewählt werden. Für denselben Bereich von Standards und bei Proben, bei denen der Pass/Fail-Cutoff größer als 1 EE/mL ist, kann eine Konzentration von bis zu 5,0 EE/mL gewählt werden. Für schmalere gefaste Standardkonzentrationsbereiche von beispielsweise 0,005 EE/mL bis 1,6 EE/mL wäre eine Konzentration von 4 λ oder 0,02 EE/mL passender, insbesondere wenn der Pass/Fail-Cutoff deutlich unter 1 EE/mL liegt.

#### Assay – Beispiel für Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten

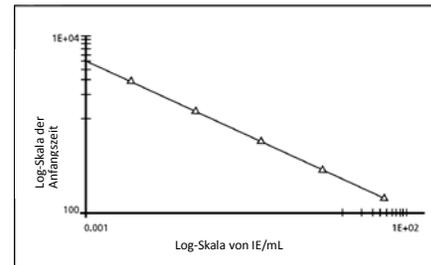
1. Proben und Kontrollen auf Raumtemperatur bringen. Unmittelbar vor dem Transfer in die Kavitäten der Mikrotiterplatte(n) jeweils kräftig auf einem Vortex-Mixer vermischen.
2. 100 µL Probe oder Kontrolle in die Mikrotiterplatte überführen.
3. Die Mikrotiterplatte mindestens 10 Minuten lang bei  $37 \pm 1$  °C vorinkubieren.
4. Das Chromo-LAL-Reagenz mit 3,2 mL LAL-Reagenzwasser oder Glucashield® Puffer rekonstituieren.
5. 100 µL des rekonstituierten Chromo-LAL-Reagenz so schnell wie möglich mithilfe einer Repeaterpipette in jede Kavität überführen. Das Verhältnis Probe zu Lysat sollte 1:1 betragen
6. Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und Reaktionsgemisch gründlich und ohne Verschütten vermischen. Einige Lesegeräte verfügen über eine solche Funktion.
7. Parafilmabdeckung entfernen und unbedeckte Mikrotiterplatte umgehend in den Mikrotiterplatten-Inkubator mit Lesegerät, das auf ein Ablesen bei 405 nm eingestellt ist, stellen und bei  $37 \pm 1$  °C inkubieren. Die kinetische Software starten.

#### Durchführungsdauer des Assays

Die bis zum Abschluss der Reaktion benötigte Zeit ist abhängig von dem für die Standardkurve gewählten Endotoxinkonzentrationsbereich und von chargenspezifischen Merkmalen. Die „Laufzeit“ mit einer Anfangs-OD von 0,05 ist für eine Assay-Sensitivität von 0,05 EE/mL typischerweise auf 60 Minuten bzw. für eine Sensitivität von 0,005 EE/mL auf 100 Minuten eingestellt.

#### ERGEBNISSE

Die Endotoxinkonzentration für die entsprechende Anfangszeit der unbekannt Probe wird von der Standardkurve, einem doppellogarithmischen Diagramm mit Anfangszeiten gegenüber Standardkonzentrationen oder einem arithmetischen Diagramm mit Logarithmen der Anfangszeiten gegenüber Logarithmen der Standardkonzentrationen, abgelesen. Eine typische Standardkurve ist unten abgebildet.



Die für die abgebildete Standardkurve generierte Gleichung für die doppellogarithmische Gerade lautet  $Y = -0,2X + 3,14$ , wobei  $Y = \text{Log Anfangszeit}$  und  $X = \text{Log Endotoxinkonzentration}$  sind. Die Endotoxinkonzentration in einer unbekannt Probe mit einer mittleren Anfangszeit von 1630 Sekunden würde errechnet werden, indem die Anfangszeit in ihren logarithmischen Wert (3,212) umgerechnet, die Gleichung nach X aufgelöst und der Antilogarithmus von X genommen wird, um die Konzentration zu erhalten:

$$X = (Y - 3,14) / -0,2$$

$$X = (3,212 - 3,14) / -0,2$$

$$X = -0,36$$

$$\text{Antilog}(-0,36) = 0,44 \text{ EE/mL}$$

#### EINSCHRÄNKUNG DES VERFAHRENS

Das Verfahren wird durch das Ausmaß der von der Testprobe gezeigten Hemmung bzw. Verstärkung eingeschränkt. Sofern die Störung durch Verdünnung oder andere Mittel an der mgV nicht beseitigt werden kann, kann der Chromo-LAL-Assay nicht zur Bestimmung von Endotoxin in der betreffenden Probe verwendet werden.

#### ERWARTETE WERTE

Das Endotoxin in der Testprobe kann im Bereich der Endotoxinkonzentrationen, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet wurden, quantifiziert werden. Um Ergebnisse in Endotoxin-Einheiten (EE) oder internationalen Einheiten (IE) von Endotoxin auszugeben, muss entweder das Standard-Referenz-Endotoxin (USP, 2. Internationaler Standard) oder ein Kontrollstandard mit einer gegen die Referenz kalibrierten Potenz verwendet werden.

Wenn die Testprobe verdünnt werden muss, um eine etwaige Hemmung bzw. Verstärkung zu beseitigen, steigt die geringste nachweisbare Endotoxinmenge entsprechend an.

#### LEISTUNGSMERKMALE

Die Linearität der Standardkurve innerhalb des Konzentrationsbereichs, der zur Bestimmung des Endotoxingehalts verwendet wird, muss durch die Durchführung des Tests an der geeigneten Anzahl von Standardkonzentrationen (siehe Kurve oben) in dreifacher Ausführung verifiziert werden (10). Die Standardkurvenparameter ohne Mittelung der Anfangszeiten der Replikate berechnen. Der absolute Wert des Korrelationskoeffizienten (r) sollte größer oder gleich 0,980 sein. Dasselbe Kriterium für Linearität gilt

für die Standardkurven, die mit Routinetests mitgeführt werden (siehe Standardkurve oben).

Hinweis: Wenn der Korrelationskoeffizient der Leistungskennlinie der linearen Regressionsanalyse die Akzeptanzkriterien von größer oder gleich 0,980 erfüllt, kann zur Erzeugung von Kontroll- und Stichprobenergebnissen eine polynomielle Regressionsanalyse verwendet werden.

#### LITERATURANGABEN

1. Bang, F.B. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362 (1953).
2. Levin, J., and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345 (1964).
3. Levin, J., and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274 (1964).
4. Levin, J., and F.B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19: 186-197.
5. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa, and K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. 81:1567-1569.
6. Iwanaga, Morita, Harada, Nakamura, Niwa, Takada, Kimura, and Sakakibara. 1978. Chromogenic Substrates for Horseshoe Crab Clotting Enzymes Its application for the assay of Bacterial Endotoxins. Haemostasis 7: 183-188.
7. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. Type I allergy induced by Limulus Amebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419 (1992).
8. Tsuji, K. and S.J. Harrison. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714 (1978).
9. USP, Bacterial endotoxins test. Current edition.
10. Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. July 15 (1991).
11. FDA 2012 Guidance for Industry, Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers
12. European Pharmacopoeia, third edition publ. Section 2.6.14. Bacterial Endotoxins. European Pharmacopoeia Secretariat, Strasbourg, June (1996).