

<h1><i>Limulus</i>-Amöbocyten-Lysat</h1>	
<h2>PYROCHROME®</h2>	
Hersteller:	
 ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED	124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Telefon:	+1 (508) 540-3444
Fax:	+1 (508) 540-8680
Technischer Support:	+1 (800) 848-3248
Kundendienst:	+1 (800) 525-8378
PN000856-de Rev1	US-Lizenz Nr. 700
	Januar 2011

PYROCHROME®

zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (Lipopolysacchariden)

Der *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL) kann, bei Verwendung gemäß den Richtlinien der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) (1), als Ersatz für den Pyrogentest (Kaninchen-Fiebertest) der U.S. Pharmacopeia (USP) für die Endprodukt-Qualitätskontrolle von „injizierbaren Humanarzneimitteln (einschließlich biologischer Produkte), injizierbaren Tierarzneimitteln und Medizinprodukten“ dienen. Der LAL-Test wird empfohlen zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen in Ausgangsstoffen für die Produktion, einschließlich Wasser, und zur Prozessüberwachung des Endotoxinspiegels. Der USP Bacterial Endotoxins Test (2) ist der amtliche LAL-Test, auf den einzelne USP-Monographien Bezug nehmen, und ist mit den entsprechenden Kapiteln der Europäischen Pharmakopöe (EP) (3) und der Japanischen Pharmakopöe (JP) (4) harmonisiert.

Zusammenfassung des Tests

Beim *Limulus*-Amöbocyten-Lysat handelt es sich um einen wässrigen Auszug der Blutzellen (Amöbocyten) des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. Bei Vorhandensein von Endotoxinen werden Faktoren im LAL aktiviert, und zwar in einer proteolytischen Kaskade, die zur Spaltung eines Substrats aus farblosem, künstlichem Peptid führt, welches im Pyrochrome®-LAL vorliegt. Die proteolytische Spaltung des Substrats setzt Paranitroanilin (pNA) frei, das gelblich ist und Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Zur Durchführung des Tests wird einem Volumenteil Probe ein Volumenteil Pyrochrome® zugesetzt und die Reaktionsmischung bei 37 °C inkubiert. Je höher die Endotoxinkonzentration in der Probe ist, umso schneller wird pNA produziert. Pyrochrome® kann auf zwei verschiedene Weisen zur quantitativen Endotoxinbestimmung verwendet werden (5). Bei der kinetischen Methode wird die Zeit bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion bei 405 nm bestimmt (die Anlaufzeit). Eine höhere Endotoxinkonzentration entspricht einer kürzeren Anlaufzeit. Für den Assay sind Spezialinstrumente notwendig, die mehrere Proben bei einer kontrollierten Temperatur (üblicherweise 37 °C) inkubieren und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte messen können. Durch Auftragen der logarithmischen Anlaufzeit gegen die logarithmische Konzentration eines Standard-Endotoxins lassen sich Standardkurven erstellen, die zur Berechnung der Endotoxinkonzentration in den Proben dienen. Alternativ dazu kann die Menge an freigesetztem pNA nach einer festen Inkubationszeit gemessen werden. Dies ist die chromogene Endpunktmethode. Zur Bestimmung der Konzentration in den Proben wird eine Standardkurve verwendet, die durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte über der bekannten Standard-Endotoxin-Konzentration erstellt wird. Bei Proben mit einer Extinktion im Bereich 405 nm bis 410 nm kann eine modifizierte Methode, die Azokupplung, verwendet werden. Bei dieser Methode lässt man pNA, das bei der chromogenen Endpunktmethode gebildet wurde, mit Nitrit in HCl und anschließend mit N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin (NEDA) reagieren, wobei sich ein diazotiertes, magentafarbiges Derivat mit einer Extinktion im Bereich 540 nm bis 550 nm bildet.

Die Pyrochrome®-Testmethoden sind schnell, spezifisch, einfach durchzuführen und hochsensitiv. Die Nachweisgrenze hängt von der verwendeten Methode und den eingesetzten Instrumenten ab und kann bis zu 0,001 Endotoxineinheiten (EU, Endotoxin Units) pro mL reichen.

Geschichte und biologisches Prinzip

Howell hat die Gerinnung von *Limulus*-Blut 1885 beschrieben (6). In den 1950er Jahren entdeckte Bang am Marine Biological Laboratory in Woods Hole, Massachusetts (USA), dass gramnegative Bakterien die Gerinnung von *Limulus*-Blut auslösen (7). Levin und Bang stellten nachfolgend fest, dass es sich dabei um eine enzymatische Reaktion handelt und dass die Enzyme sich in Körnchen in den Amöbocyten befinden (8, 9). Sie konnten nachweisen, dass die Gerinnung durch eine charakteristische Struktur der Zellwand des Bakteriums ausgelöst wird, das Endotoxin bzw. Lipopolysaccharid (10). Man geht heute davon aus, dass die Reaktion aus einer Kaskade von Enzymaktivierungsschritten besteht, die in der Spaltung des Proteins Koagulogen enden. Das unlösliche Spaltprodukt von Koagulogen (das Koagulin) verfestigt sich durch Ioneninteraktion. Bildet sich genügend Koagulin, führt dies zur

Trübung und anschließend zur Bildung eines Gel-Clot. Diese Wechselwirkung ist die Grundlage für einen Assay auf Endotoxine, der als *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL) bezeichnet wird. Im Jahre 1977 entdeckten japanische Forscher, dass endotoxin-aktiviertes LAL auch kleine chromogene Peptide spalten kann, die eine Aminosäure-Spaltstelle ähnlich dem Koagulogen und dem Chromophor Paranitroanilid enthalten (11). Die Spaltung setzt pNA frei, das gelblich ist und Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Bei dieser chromogenen Adaption des LAL-Assays wird die Koagulogen-konzentration durch Verdünnung herabgesetzt, um die Interferenz bei der Zugabe des chromogenen Substrats zum LAL zu minimieren. Daher führt die Zugabe von Endotoxinen zu chromogenem LAL-Reagens vorzugsweise zur Farbbildung und nicht zur Trübung oder Bildung eines Gel-Clots. Für alle Versionen des LAL-Assays (Gel-Clot, turbidimetrisch und chromogen) gilt, dass der Endpunkt (Gel-Clot, Trübung oder Färbung) umso schneller erreicht wird, je mehr Endotoxine vorhanden sind. Näheres zu den LAL-Assaytypen, der Reaktion und den Anwendungen findet sich in der Literatur (12, 13, 14).

Reagens

Pyrochrome® ist als Lyophilisat in Packungen zu 3,2 mL/Fläschchen erhältlich. Es enthält einen wässrigen Auszug von *Limulus-polyphemus*-Amöbocyten, Stabilisator, Salze, Puffer und ein chromogenes Substrat.

Pyrochrome® ist nicht mit einer bestimmten Empfindlichkeit ausgezeichnet. Die Empfindlichkeit im Test (mit λ bezeichnet) ist jeweils die niedrigste Endotoxinkonzentration, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet wurde. Die höchste Empfindlichkeit (λ) von Pyrochrome® beträgt 0,001 EU/mL in einem kinetischen Assay und 0,005 EU/mL in einem Endpunktassay. Pyrochrome® dient nur zur *In-vitro*-Diagnostik. Es ist nicht zur Diagnose einer Endotoxämie beim Menschen bestimmt. Die Toxizität von Pyrochrome® ist nicht bestimmt worden. Jedoch hat der langdauernde oder wiederholte Hautkontakt mit LAL bei manchen Personen zu einer allergischen Reaktion vom Typ I geführt (15). Beim Umgang mit Pyrochrome® ist daher Vorsicht geboten.

Vorgehen zur Rekonstitution:

- Pyrochrome®-Fläschchen leicht antippen, damit sich loses Material auf dem Boden des Fläschchens absetzt. Durch Anheben des grauen Stopfens das Vakuum aufheben. Dabei die Mündung des Fläschchens nicht kontaminieren. Den Stopfen abnehmen und entsorgen. Nicht durch den Stopfen injizieren oder diesen wieder verwenden. Eine kleine, am Stopfen verbleibende Menge LAL-Pulver beeinträchtigt den Test nicht.
- Pyrochrome® mit 3,2 mL Pyrochrome®-Puffer bzw. Glucashield®-Puffer (einzeln erhältlich von Associates of Cape Cod, Inc.) rekonstituieren. Zur Erzielung einer Empfindlichkeit von 0,001 EU/mL mit einem Plattenfotometer muss Pyrochrome® mit Glucashield® rekonstituiert werden. Wenn ein Röhrchen-Lesegerät verwendet wird, ist diese Empfindlichkeit sowohl mit Pyrochrome®-Rekonstitutionspuffer als auch mit Glucashield®-Puffer zu erzielen. Es dauert einige Minuten, bis sich die Tablette aufgelöst hat. Deswegen mindestens 5 Minuten vor der Anwendung rehydrieren. Das Fläschchen zur Homogenisierung schwenken, jedoch heftiges Schütteln vermeiden, das übermäßige Schaumbildung und Empfindlichkeitsverlust verursachen kann. Das Fläschchen mit Parafilm M® abdecken und bei Nichtgebrauch kalt (bei 2 °C bis 8 °C) lagern. Pyrochrome® muss innerhalb von 8 Stunden nach der Rekonstitution verwendet werden.

Lagerbedingungen

Gefriergetrocknetes Pyrochrome® ist relativ stabil und behält bei sachgemäßer Lagerung seine volle Aktivität bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verwendbarkeitsdatum. Produkt bei 2 °C bis 8 °C lagern. Temperaturen über 37 °C können die rasche Zersetzung von gefriergetrocknetem Pyrochrome® verursachen, was sich als Empfindlichkeitsverlust und deutliche Gelbfärbung des Produktes äußert. Pyrochrome® wird zum Schutz vor hohen Temperaturen in Isolierbehältern versandt. Pyrochrome® ist vor der Rekonstitution lichtempfindlich und muss dunkel gelagert werden.

Nach Rekonstitution liegt Pyrochrome® normalerweise in einer klaren und leicht opaleszierenden Lösung vor. Einzelne Chargen weisen gelegentlich eine leichte, uniforme Trübung auf. Das Vorliegen kleiner Fasern oder Stränge ist kein Hinweis auf Kontamination oder eine Beeinträchtigung der Aktivität; Ausflockung oder eine deutliche Gelbfärbung weist allerdings auf eine Zersetzung des Reagens hin und das Reagens darf in diesem Fall nicht verwendet werden. Rekonstituiertes Pyrochrome® ist weniger stabil als das gefriergetrocknete Produkt. Die Fläschchen dürfen bis zu 8 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Zu beachten ist, dass die maximale Empfindlichkeit gegebenenfalls nur mit frisch rekonstituiertem Reagens erreicht wird. Rekonstituiertes Pyrochrome® darf nicht eingefroren werden.

Probennahme und -vorbereitung

Proben sind aseptisch in Behälter zu nehmen, die keine nachweisbaren Endotoxine enthalten. Zur Minimierung der Adsorption von Endotoxinen an die Behälteroberfläche werden wieder verwendete, entpyrogenisierte Glasbehälter oder sterile Einweg-Kunststoffbehälter aus Polystyrol oder Polyethylenterephthalat (PET) empfohlen. Kunststoffbehälter sind nicht grundsätzlich frei von nachweisbaren Endotoxinen. Außerdem können lösliche Substanzen aus manchen Kunststoffen den Test stören. Das Laborgeschirr muss auf seine Eignung getestet werden. Dazu Behälter zufällig aus einer Charge auswählen, mit einem kleinen Volumen LAL-Reagenswasser (LRW) eine Stunde lang bei Raumtemperatur ausspülen und das Spülwasser wie eine Probe

testen. Die Endotoxinkonzentration im Spülwasser muss erheblich unter der Konzentration des niedrigsten verwendeten Standards liegen. Auch darf das Spülwasser den Test weder hemmen noch fördern, was durch die Wiederfindung einer bekannten Dotierung mit Endotoxinen bestimmt wird. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches (ein Volumenteil Probe bzw. verdünnte Probe gemischt mit dem gleichen Volumen Pyrochrome®) muss bei 6 bis 8 liegen. Den pH-Wert der Probe mit HCl, NaOH oder Puffer (keine nachweisbaren Endotoxine enthaltend) einstellen. Konzentrierte HCl oder NaOH mit LRW auf eine entsprechende Konzentration verdünnen und ein Volumen anwenden, das nicht zu einer signifikanten Verdünnung der Testprobe führt. Falls sich bei der pH-Einstellung in der Probe ein Niederschlag bildet, die Probe vor der pH-Einstellung verdünnen (dabei die hgV nicht überschreiten – siehe „Grenzen des Verfahrens“). Den pH-Wert von ungepuffeter Kochsalzlösung bzw. Wasser nicht einstellen. Die Verdünnung selbst kann eventuell Probleme mit dem pH-Wert lösen.

Substanzen, die Proteine denaturieren, Chelatkomplexe mit Ionen bilden, Endotoxine binden oder den hydrophoben Charakter der Endotoxine verändern, können den Test stören. Die Interferenz äußert sich u.U. als Wiederfindung von erheblich größeren oder kleineren Endotoxinmengen, als nach Zugabe einer bekannten Menge an Standard-Endotoxin zur Probe zu erwarten ist (siehe „Grenzen des Verfahrens“). In den meisten Fällen führt eine Verdünnung der Probe zu einer verminderten Konzentration und Aktivität der Störsubstanzen bei weiterhin gültigen Testergebnissen. Die geeigneten Kontrollen und Verdünnungswerte werden im Abschnitt „Testverfahren“ besprochen. Proben sind so bald wie möglich nach der Entnahme zu testen. Es kann ratsam sein, unsterile Proben, die vor dem Test gelagert oder verschickt werden sollen, einzufrieren. Proben mit einer niedrigen erwarteten Endotoxinkonzentration sollten auf Endotoxinminderung während der Lagerung getestet werden.

Testverfahren

Mit Pyrochrome® gelieferte Testreagenzien

- Pyrochrome*® (siehe Beschreibung oben unter „Reagens“ und „Vorgehen zur Rekonstitution“).
- Pyrochrome*®-*Rekonstitutionspuffer* (nur Katalognummer C1500). Den Puffer wie oben beschrieben zur Rekonstitution von Pyrochrome® verwenden.
- Glucashield*®-*Rekonstitutionspuffer* (nur Katalognummer CG1500). Den Puffer wie oben beschrieben zur Rekonstitution von Pyrochrome® verwenden.
- Kontroll-Standard-Endotoxin* (KSE) – nur Diazo-Kit (CD060): Jedes Fläschchen KSE enthält 10 ng. Das KSE mit dem im Analysezertifikat (AZ, gibt die Wirkstärke des KSE an) angegebenen Volumen rekonstituieren. Das KSE ist speziell auf leichte Lösbarkeit ausgelegt. Fläschchen nach der Zugabe von LRW 30 bis 60 Sekunden lang im Vortex mischen. Das KSE ist nunmehr gebrauchsfertig. Wird es nicht sofort verwendet, das Fläschchen vor der Verwendung erneut 30 Sekunden lang im Vortex mischen. Dann die Verdünnungen herstellen, die den gewünschten Endotoxinkonzentrationen entsprechen. Zwischen den Verdünnungsschritten im Vortex mischen. Bei Lagerung zwischen 2 °C und 8 °C ist rekonstituiertes KSE sieben Tage lang stabil. Rekonstituiertes KSE nicht einfrieren.

Jedes Fläschchen KSE enthält Endotoxin, dessen Aktivität in Bezug auf das US-Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) bestimmt wurde und auf dem AZ angegeben ist. Der Endotoxin-Referenzstandard nach USP (ident mit RSE) kann von U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., bezogen werden.

Hinweis: Das AZ und die darauf angegebene Wirkstärke gehören zu einer bestimmten Kombination von Pyrochrome®- und KSE-Charge. Die gleiche Charge KSE kann beim Test mit Pyrochrome® aus verschiedenen Chargen bzw. mit Pyrotell oder Pyrotell-T u.U. verschiedene Wirkstärken (in EU/ng) aufweisen. Ebenso hat KSE aus verschiedenen Chargen beim Test mit Pyrochrome® aus der gleichen Charge wahrscheinlich verschiedene Wirkstärken. **Darauf achten, dass das richtige AZ und die richtige Wirkstärke verwendet werden.**

Das KSE zur Zubereitung von Standard-Endotoxinkonzentrationen verwenden, mit denen Standardkurven erstellt werden und die als Positivkontrollen und Produkt-Positivkontrollen (Interferenzkontrollen) dienen. Dieses KSE (10 ng/Fläschchen) nicht als Entpyrogenisierungskontrolle verwenden.

- Diazo-Reagenzien* – nur Diazo-Kit (CD060): Fläschchen 1a: HCl; Fläschchen 1: Natriumnitrit; Fläschchen 2: Ammoniumsulfamat; Fläschchen 3: NEDA. Fläschchen 1 mit dem gesamten Inhalt von Fläschchen 1a rekonstituieren. Fläschchen 2 mit 4 mL Wasser rekonstituieren. Fläschchen 3 mit 4 mL Wasser rekonstituieren. Zur erforderlichen Wasserqualität siehe Punkt 5 unten.

Nicht mit Pyrochrome® gelieferte Testreagenzien

- Kontroll-Standard-Endotoxin* (KSE). (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer EC010). Das KSE mit dem im Analysezertifikat (AZ, gibt die Wirkstärke des KSE an) angegebenen Volumen und nach den Anweisungen in der Packungsbeilage rekonstituieren. Die Anweisungen in der Packungsbeilage zur Verwendung und Lagerung von Standard-Endotoxin folgen. Die Wirkstärke des KSE wurde in Bezug auf das US-Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) bestimmt und ist auf dem AZ angegeben. Der Endotoxin-Referenzstandard nach USP (ident mit RSE) kann von U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., bezogen werden. **Hinweis:** Das AZ und die darauf angegebene Wirkstärke gehören zu einer bestimmten Kombination von Pyrochrome®- und KSE-Charge. Die gleiche Charge KSE kann beim Test mit

Pyrochrome® aus verschiedenen Chargen bzw. mit Pyrotell oder LAL-Reagenzien anderer Hersteller u.U. verschiedene Wirkstärken (in EU/ng) aufweisen (1). Ebenso hat KSE aus verschiedenen Chargen beim Test mit Pyrochrome® aus der gleichen Charge wahrscheinlich verschiedene Wirkstärken. **Darauf achten, dass das richtige AZ und die richtige Wirkstärke verwendet werden.**

Das KSE zur Zubereitung von Standard-Endotoxinverdünnungen verwenden, mit denen Standardkurven erstellt werden und die als Positivkontrollen und Produkt-Positivkontrollen (Interferenzkontrollen) dienen.

- LAL-Reagenswasser* (LRW). Empfohlene Bezugsquellen: Associates of Cape Cod, Inc. (verschiedene Packungsgrößen und -konfigurationen erhältlich) sowie andere. Im Handel erhältliches steriles Wasser für Injektionszwecke (steriles WfI) nach USP ohne Bakteriostatika oder Wasser zur Irrigation nach USP kann verwendet werden, vorausgesetzt, es ist nachweislich zur Verwendung als LRW geeignet. Der Endotoxin-Grenzwert für steriles WfI nach USP beträgt lediglich 0,25 EU/mL. Daher kann steriles WfI nachweisbare Mengen Endotoxine enthalten und zum Gebrauch ungeeignet sein.

Zum Nachweis der Eignung von Wasser als LRW muss es wie eine Probe mit einer Produkt-Positivkontrolle getestet werden (siehe Punkt 1.c. im Abschnitt „Kontrollen“). Zur Verdünnung von Standards und zur Zubereitung von Positivkontrollen zertifiziertes LRW verwenden (siehe Punkte 1.a. und 1.b. unter „Kontrollen“). Aus den Anlaufzeiten oder den Endpunktassays für die Standards eine Standardkurve erstellen. Der Korrelationskoeffizient muss mindestens 0,980 betragen (Absolutwert). Die Endotoxinkonzentration des getesteten Wassers lässt sich durch Extrapolation der Standardkurve unterhalb der niedrigsten Endotoxinkonzentration abschätzen und muss erheblich unter der des niedrigsten Standards liegen. Außerdem muss die Endotoxinkonzentration der Produkt-Positivkontrolle innerhalb von ± 25% des Wertes einer Positivkontrolle liegen.

- Glucashield*®-*Puffer*. Erhältlich bei Associates of Cape Cod, Inc. (Katalognummer GB051). Kann an Stelle des Pyrochrome®-Rekonstitutionspuffers verwendet werden, um Störungen durch (1→3)-Beta-D-Glukane zu beheben.

- 50%ige Essigsäure* (für die Endpunktmethode). Durch Zugabe von einem Volumenteil Eisessig zu einem gleichen Volumen destilliertem oder Umkehrosmose-Wasser zubereiten. (LRW – siehe oben unter 2. – kann verwendet werden, ist jedoch nicht notwendig.)

- Wasser* (nur für die Rekonstitution der Azokupplungsreagenzien). Zulässig sind alle Laborquellen für destilliertes (einschließlich LRW), entionisiertes oder Umkehrosmose-Wasser. Dieses Wasser muss nicht endotoxinfrei sein, da es nur für die Azokupplungschemikalien verwendet wird.

Material und Ausrüstung

- Mikrotiterplatten*. Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und Abdeckung (erhältlich bei Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer CA961). Die Mikrotiterplatten müssen hinsichtlich des Endotoxin- bzw. Glukangehaltes zertifiziert sein oder getestet werden und dürfen den Test weder hemmen noch fördern. Mikrotiterplatte vor Verwendung überprüfen und Platte verwerfen, falls Kratzer oder andere optische Interferenzen am Boden der Vertiefungen (innen oder außen) beobachtet werden.

- Reaktionsröhrchen*. Kinetische Assays können mit einem Röhrchen-Lesegerät mit Inkubator, beispielsweise mit Pyros Kinetix® Flex, unter Verwendung von entpyrogenisierten Kulturröhrchen der Größe 8 x 75 mm aus Borosilikatglas (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer TK100) durchgeführt werden. Die Endpunkt-Assays können in entpyrogenisierten Kulturröhrchen der Größe 8 x 75 mm oder 10 x 75 mm aus Borosilikatglas (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer TK100 bzw. TB050) durchgeführt werden.

- Fotometer*, das bei 405 nm (bzw. 540 nm bis 550 nm bei der Azomethode) ablesen kann. Bei Anwendung der kinetischen Methode ein Plattenfotometer mit Inkubator wie beispielsweise das ELx808™ von BioTek® oder das VersaMax™ von Molecular Devices oder ein Röhrchen-Lesegerät zu den Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc. Katalognummer PKF32, PKF64 und PKF96) verwenden.

Für die Endpunktmethode ein Plattenfotometer zur Ablesung der Mikrotiterplatten verwenden oder, wenn der Test in Röhrchen durchgeführt wird, ein Spektrofotometer mit entsprechenden Küvetten.

- Inkubator*, der 37±1 °C einhalten kann (nur für die Endpunktmethoden notwendig). Ein Trocken-Blockinkubator für Mikrotiterplatten (bzw. Röhrchen) wird empfohlen. (Für die Endpunktmethode mit Teströhrchen kann ein Wasserbad verwendet werden.) Die Inkubatoren sollten eine nachweislich uniforme Wärmeverteilung aufweisen.

- Teströhrchenhalter* zum Halten bzw. zur Inkubation von Verdünnungs- und Reaktionsröhrchen.

- Pipetten*, Mikropipetten mit Pipettenspitzen (bei der Anwendung von Mikrotiterplatten sind Mehrkanalpipetten hilfreich) oder Mehrkanalpipetten mit Spritzenzylinder aus Kunststoff. Empfohlen werden Einwegpipetten und -spitzen, die frei von störenden Endotoxinen bzw. Glukanen sind. Associates of Cape Cod, Inc., bietet die Produktlinie Pyroclear® an, die per Zertifikat frei von störenden Endotoxinen bzw. Glukanen ist.

- Vortex-Mixer*.

- Parafilm M*® (American National Can™). Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist typischerweise frei von nachweisbaren Endotoxinen.
- Teströhrchen*, die frei von störenden Endotoxinen und ausreichend groß sind, um Endotoxinstandards bzw. Proben darin zu verdünnen. Angaben zu Behältern, die für Verdünnungen geeignet sind, siehe unter „Probennahme und -vorbereitung“.
- Heißluftofen*, der bis auf mindestens 250 °C aufheizt, zur Entpyrogenisierung von Glasartikeln. Die üblichen Entpyrogenisierungszyklen gewährleisten, dass alle Artikel im Ofen mindestens 30 Minuten lang einer Temperatur von mindestens 250 °C ausgesetzt werden (2, 16, 17).

Kontrollen

Kontrollen sind für einen gültigen Test zwingend notwendig. Die FDA (1) und die USP (2), EP (3) und JP (4) haben empfohlene Verfahren ausgearbeitet.

1. Endotoxinkontrollen.

- Endotoxinstandardreihe.** Für jeden Test einen neuen Satz Verdünnungen aus der Stamm-Endotoxinlösung zubereiten. Zuvor zubereitete und eingelagerte Verdünnungen dürfen nur verwendet werden, wenn die Stabilität dieses Konzentrationsbereiches nachgewiesen ist. Verdünnungen in geometrischer Reihe herstellen, so dass der erforderliche Endotoxin-Konzentrationsbereich erzielt wird. Für die Endpunktmethodeen empfiehlt sich die Verdünnung auf das Doppelte. Für die kinetische Methode können höhere Verdünnungen verwendet werden. Die niedrigste Endotoxinkonzentration einer Standardreihe bildet jeweils die Nachweisgrenze des einzelnen Tests und wird mit λ bezeichnet (**Hinweis:** Bei Endpunkt- und kinetischen Tests sind mit Pyrochrome® Nachweisgrenzen von 0,005 bzw. 0,001 EU/mL möglich). Bei der Herstellung der erforderlichen Standardreihe die geringstmögliche Anzahl Verdünnungen und sachgemäße Pipettenvolumina verwenden, um höchstmögliche Genauigkeit zu erreichen. Die Verdünnungen können in Glas- oder geeigneten Kunststoffröhrchen oder direkt in einer Mikrotiterplatte hergestellt werden. Die mit Pyrochrome® nachweisbaren Maximalkonzentrationen hängen von der Methode ab. Als Richtwert gelten die für Pyrochrome® erhältlichen empfohlenen Inkubationszeiten.
- Eine Positivkontrolle** (eine einzelne Standard-Endotoxin-Konzentration) ist mitzuführen, wenn die Standardreihe (siehe oben unter a.) nicht auf die gleiche Weise wie die Produkt-Positivkontrollen zubereitet wird (siehe unten unter c.). Die Endotoxinkonzentration der Positivkontrolle sollte derjenigen eines Standards aus der Mitte der Standardkurve entsprechen. Ein Wert von 0,5 EU/mL wäre angemessen für Positivkontrollen, die mit einer Standardreihe aus den Konzentrationen 0,005, 0,05, 0,5, 5 und 50 EU/mL mitgeführt werden. Wird in einem Test keine Standardreihe mitgeführt, dann muss eine Positivkontrolle mitgeführt werden, um zu bestätigen, dass die Parameter einer vorherigen (archivierten) Standardkurve zur Berechnung von Endotoxinkonzentrationen verwendet werden können. Einzelheiten sind in der FDA-Richtlinie (1) im Abschnitt „Routine Testing of Drugs by the LAL Test“ zu finden. Die Positivkontrolle wird auf die gleiche Weise mit Wasser zubereitet wie die Produkt-Positivkontrolle mit Produkt.
- Produkt-Positivkontrollen sind Hemm-/Förderkontrollen und bestehen aus der Probe oder verdünnten Probe mit einem Zusatz von Standard-Endotoxin. Die Konzentration des Endotoxinzusatzes in der Probe muss der Konzentration der Positivkontrolle entsprechen. Zur Auswahl der geeigneten Endotoxinkonzentration für die Produkt-Positivkontrolle siehe Abschnitt b. oben. Der Endotoxinzusatz wird oft als „Dotierung“ bezeichnet.

2. Negativkontrollen.

Negativkontrollen in Form von LRW müssen bei jedem Test mitgeführt werden.

Probenvorbereitung – Bestimmung der Testverdünnung

Wenn bereits ein Testprotokoll für den zu testenden Probentyp entwickelt wurde, die für den Assay notwendige Verdünnung herstellen und wie unter „Testdurchführung“ beschrieben fortfahren. Wenn für den Probentyp noch kein Protokoll entwickelt wurde, eine Reihe aus zehnfachen Verdünnungen der Probe herstellen. Die höchste gültige Verdünnung des Produktes höchstens um den Faktor 10 überschreiten. (Erläuterungen und Rechenbeispiele zur höchsten gültigen Verdünnung [hgV] und niedrigsten gültigen Konzentration [ngK] sind im Abschnitt „Grenzen des Verfahrens“ unten oder in der FDA-Richtlinie [1] zu finden.) Zweckdienliche Verdünnungen aller Proben zubereiten, jeweils mit einer Produkt-Positivkontrolle.

Testdurchführung

Zum Erreichen zufriedenstellender Ergebnisse ist eine gleichbleibende Technik notwendig. Alle Kontrollen und Proben müssen mindestens zweifach getestet werden. Bei der Vorbereitung des Tests ist mit Vorsicht vorzugehen, um eine Kontamination zu vermeiden. Zur Gewährleistung einheitlicher Inkubationstemperaturen müssen alle Geräte entsprechend kalibriert und qualifiziert werden.

1. Die Testinstrumente nach Bedarf vorbereiten. Bei einem automatischen System bedeutet dies in der Regel das Eingeben der Probenbeschreibungen, das Einstellen der Testparameter und das Einschalten des auf 37 °C eingestellten Inkubators.

2. Das entsprechende Probenvolumen (Negativkontrolle, Endotoxin-Standard, Probe oder Produkt-Positivkontrolle) in das Reaktionsgefäß geben, sodass beim Zusatz von Pyrochrome® ein adäquates Verhältnis zustande kommt (siehe 3. unten).

Tests, die mit dem Plattenfotometer durchgeführt werden: ein Verhältnis von Lysat zu Probe von 1:1 verwenden. Zur Erzielung der bestmöglichen Leistung bei allen derartigen Methoden (kinetische, Endpunkt- oder Azokupplungsmethode) ein Volumen von 0,05 mL Probe verwenden. Bei der kinetischen und Endpunktmethode kann auch ein Volumen von 0,1 mL verwendet werden. Zur Erzielung der maximalen Empfindlichkeit oder bei einer Standardkurve über einen großen Bereich (Bereich größer als drei Zehnerpotenzen) werden aber 0,05 mL empfohlen.

Tests, die mit dem Röhrchen-Lesegerät Pyros Kinetix® Flex durchgeführt werden: das Verhältnis von Lysat zu Probe kann entweder 1:1 oder 1:4 betragen. Bei Durchführung von Tests unter Verwendung eines Verhältnisses von 1:1 zwischen Pyrochrome®-LAL-Reagens und Probe ist ein Probenvolumen von 0,1 mL erforderlich. Bei Durchführung von Tests mit dem Röhrchen-Lesegerät Pyros Kinetix® Flex, bei denen ein Verhältnis von 1:4 zwischen Pyrochrome®-LAL-Reagens und Probe eingesetzt wird, sollte das Probenvolumen 0,2 mL betragen.

3. Entsprechend der Methode Pyrochrome® zusetzen und mischen. Unbefriedigende Testergebnisse sind oft auf unzureichendes Mischen zurückzuführen. Die meisten Plattenlesegeräte verfügen über eine Schüttelfunktion.

- Bei Verwendung einer Mikrotiterplatte beträgt das Verhältnis zwischen Lysat und Probe 1:1 und das zugesetzte Volumen von Pyrochrome® entspricht dem Probenvolumen (siehe Punkt 2. oben; typischerweise 0,05 mL). Pyrochrome® so rasch wie möglich allen Proben zusetzen und 5 bis 30 Sekunden lang mischen. Die Platte entweder auf einen Inkubatorblock (bei einem Endpunkttest) oder in ein Plattenfotometer mit Inkubator (bei einem kinetischen Test) stellen.

- Bei Methoden, bei denen einzelne Reaktionsröhrchen oder Küvetten verwendet werden, kann das zugesetzte Volumen von Pyrochrome® entweder dem Probenvolumen entsprechen (0,1 mL bei Verwendung eines Röhrchen-Lesegeräts Pyros Kinetix® Flex) oder ein Viertel des Probenvolumens betragen (0,05 mL bei Verwendung eines Röhrchen-Lesegeräts Pyros Kinetix® Flex). Wichtig: Die Reaktionszeit sollte in allen Röhrchen gleich sein. Bei Verwendung des Röhrchen-Lesegeräts Pyros Kinetix® Flex wird das das Reaktionsröhrchen nach Einführung in das Gerät erkannt und die Zeitmessung in Gang gesetzt. Pyrochrome® der Reihe nach jedem Reaktionsgefäß zusetzen, etwa 2 Sekunden lang mischen und das Gefäß in das Inkubationsgerät (bei Endpunkttests) oder das Röhrchen-Lesegerät (bei kinetischen Tests) stellen.

Unabhängig davon, ob Mikrotiterplatten oder Reaktionsröhrchen verwendet werden, ist eine Mehrkanalpipette für die Zugabe von Pyrochrome® hilfreich.

Das Reagens ist mit Vorsicht zu behandeln, um eine Kontamination des Pyrochrome®-Fläschchens zu vermeiden.

4. Das Testergebnis ablesen.

- Bei der kinetischen Methode den Test so lange laufen lassen, bis alle Proben deutlich länger inkubiert wurden, als es dauert, bis die niedrigste Standard-Endotoxin-Konzentration den Anlauf-OD405-Wert erreicht hat. Automatische Testsysteme brechen üblicherweise den Test nach einer zuvor eingestellten Dauer ab. Die empfohlenen Inkubationszeiten als Richtwert anfordern.
- Bei der Endpunktmethode die Inkubationszeit genau messen, die Platte bzw. die Reaktionsröhrchen aus dem Inkubator nehmen, die Reaktion mit 50%iger Essigsäure stoppen (das Volumen muss eine Endkonzentration von 10% Essigsäure ergeben; für Proben- und Pyrochrome®-Volumen von je 0,05 mL sind 0,025 mL zu verwenden) und die optische Dichte (OD) bei 405 nm in einem Spektrofotometer bzw. Plattenfotometer ablesen. Der Test sollte so gestaltet und ausgewertet werden, dass die Inkubationszeit für alle Proben gleich ist (innerhalb von ±30 Sekunden). Die Inkubationsdauer hängt vom gewünschten Bereich der Endotoxinkonzentrationen ab und ist wahrscheinlich von einer Pyrochrome®-Charge zur anderen unterschiedlich. Eventuell sind zur Bestimmung der richtigen Inkubationsdauer Vortests erforderlich. Die empfohlenen Inkubationszeiten bieten Richtwerte.
- Bei der Endpunktmethode mit Azokupplung die Reaktionsröhrchen bzw. die Platte aus dem Inkubator nehmen und die Reaktion durch Zugabe von 0,05 mL Lösung 1 (mit HCl rekonstituiertes Natriumnitrit) stoppen. Zum Mischen die Platte agitieren. Mit einer neuen Pipettenspitze in jede Reaktionskavität 0,05 mL Lösung 2 (Ammoniumsulfamat) geben und mischen. Abschließend mit einer neuen Pipettenspitze in jede Kavität 0,05 mL Lösung 3 (NEDA) geben und mischen. Der Farbumschlag nach Magenta sollte sofort und vollständig erfolgen. Den Test bei 540 nm bis 550 nm ablesen. Der Test sollte so gestaltet und ausgewertet werden, dass die Inkubationszeit für alle Proben gleich ist (innerhalb von ±30 Sekunden). Die Inkubationsdauer hängt vom gewünschten Bereich der Endotoxinkonzentrationen ab und ist wahrscheinlich von einer Pyrochrome®-Charge zur anderen unterschiedlich.

Eventuell sind zur Bestimmung der richtigen Inkubationsdauer Vortests erforderlich.

Ergebnisse

1. Vorläufige Berechnungen.

- Bei der kinetischen Methode die Zeit bestimmen, die die Proben bis zum Erreichen einer bestimmten Schwellen-OD (normalerweise 0,03 OD-Einheiten)

benötigen, unter Berücksichtigung aller etwaigen Datenkorrekturen. Die OD-Werte müssen sich auf einen als null OD-Einheiten definierten Ausgangswert beziehen. Plattenfotometer verfügen oft über Software, die diese Berechnungen vornimmt. Die Zeit bis zum Erreichen des OD-Wertes heißt Anlaufzeit.

2. Eine Standardkurve erstellen.

- Bei der kinetischen Methode wird eine Standardkurve erstellt durch Regression der logarithmischen Anlaufzeit über der logarithmischen Endotoxinkonzentration der Standards. Die Gleichung für die Regressionsgerade beschreibt die Standardkurve.

Vorausgesetzt, dass der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten der Standardkurve mindestens 0,980 beträgt (siehe nachstehenden Punkt 2. unter „Interpretation“) kann eine polynomiale Regressionsgleichung zweiter Ordnung/zweiten Grades (d.h. eine quadratische Regressionsgleichung) zur Berechnung der Endotoxinkonzentration verwendet werden.

- Bei der Endpunktmethode wird die Standardkurve erstellt durch Auftragen der OD-Werte über den Endotoxinkonzentrationen der Standards.

3. Die Endotoxinkonzentrationen berechnen.

Die Endotoxinkonzentrationen aller Proben (einschließlich Standards und Kontrollen) anhand der folgenden Geradengleichung berechnen: Y = aX + b nach Umwandlung zu X = (Y – b) / a

wobei:

Y = logarithmische Anlaufzeit (kinetische Methode) oder optische Dichte (Endpunktmethode)

X: Kinetische Methode: X = logarithmische Endotoxinkonzentration (zur Berechnung der Endotoxinkonzentration muss der Antilogarithmus von X bestimmt werden)
Endpunktmethode: X = Endotoxinkonzentration

a = Steigung der Geraden

b = Y-Achsenabschnitt

Die aus der Standardkurve berechnete Endotoxinkonzentration mit der Verdünnung der Probe multiplizieren, um die Konzentration der ursprünglichen, unverdünnten Probe anzugeben.

Diese Berechnungen werden üblicherweise durch die Endotoxin-Testsoftware durchgeführt.

Interpretation

- Damit ein Test gültig ist, muss die (durch Extrapolation der Standardkurve geschätzte) Endotoxinkonzentration der Negativkontrollen deutlich unter derjenigen des niedrigsten Standards liegen.
- Der Korrelationskoeffizient für die dem Test beiliegende Standardkurve sollte einen Absolutwert von mindestens 0,980 haben.
- Der Durchschnitt der gemessenen Endotoxinkonzentrationen der Positivkontrollen (bei Bestätigung einer Archivkurve) darf nicht mehr als 25% von der Nennkonzentration abweichen. Bei einer Positivkontrolle von 0,125 EU/mL muss der Messwert also zwischen 0,09375 EU/mL und 0,15625 EU/mL liegen.
- Endotoxinkonzentrationen können nur im Bereich von der niedrigsten bis zur höchsten Standard-Endotoxin-Konzentration angegeben werden. Ergebnisse für Proben, die außerhalb dieses Bereiches liegen, sollten als unterhalb der niedrigsten Standardkonzentration (nicht nachweisbar) bzw. oberhalb der höchsten Standardkonzentration angegeben werden.

Bei der Endpunktmethode können gültige Endotoxinkonzentrationen nur aus OD-Werten berechnet werden, die im linearen Teil der Standardkurve liegen.

- Zur Bestätigung, dass die Probe die LAL/Endotoxinreaktion nicht wesentlich stört, muss die gemessene Endotoxinkonzentration der Produkt-Positivkontrolle innerhalb von 50% bis 200% der Nennkonzentration der Endotoxindotierung liegen. Vor der Bestimmung, ob die Dotierung innerhalb dieser Grenzwerte wiedergefunden wurde, die in der (undotierten) Probe gemessene Endotoxinkonzentration subtrahieren. Zum Beispiel muss die gemessene Endotoxinkonzentration einer Produkt-Positivkontrolle von 0,125 EU/mL (nach der Subtraktion etwaiger Endotoxine in der undotierten Probe) im Bereich von 0,0625 EU/mL bis 0,25 EU/mL (50% bis 200% von 0,125 EU/mL) liegen, damit diese als frei von wesentlicher Interferenz angesehen werden kann. Beträgt die gemessene Endotoxinkonzentration in der undotierten Probe 0,028 EU/mL und die in der Produkt-Positivkontrolle 0,163 EU/mL, dann sind 0,163 EU/mL – 0,028 EU/mL = 0,135 EU/mL Endotoxine auf die Dotierung zurückzuführen. Dieser Wert liegt im zulässigen Bereich und der Test der Probe ist gültig, vorausgesetzt, die anderen Anforderungen sind erfüllt.

Grenzen des Verfahrens

Das Verfahren wird durch das Ausmaß der Hemm- bzw. Förderfähigkeit der getesteten Probe begrenzt. Falls das Verfahren nicht bei einer Probenkonzentration über der niedrigsten gültigen Konzentration (ngK) validiert werden kann (1, 2), ist eine

Verwendung des bakteriellen Endotoxintests mit LAL-Reagenzien anstelle des Pyrogenests nach USP nicht möglich. Die ngK berechnet sich wie folgt:

ngK =

λ

(
E
n
d
o
t
o
x
i
n
-
T
o
l
e
r
a
n
z
g
r
e
n
z
w
e
r
t
)

{\displaystyle \lambda \; \over (Endotoxin-Toleranzgrenzwert)}

wobei λ in EU/mL, die Probendosis in Einheiten pro kg Körpergewicht und der Endotoxin-Toleranzgrenzwert in EU/kg angegeben wird.

Die höchste gültige Verdünnung (hgV) ist die Probenverdünnung, die die ngK enthält (1). Sie wird berechnet, indem man die Ausgangs-Probenkonzentration durch die ngK dividiert.

Der Endotoxin-Toleranzgrenzwert beträgt 0,2 EU/kg bei Arzneimitteln zur intrathekalen Verabreichung und 5 EU/kg für alle anderen parenteralen Arzneimittel. Für Medizinprodukte wird der Grenzwert pro mL eines Extrakt- bzw. Spülvolumens angegeben, das wie in der USP (18) beschrieben gewonnen wurde, auf Grundlage der Grenzwerte für Medizinprodukte. Bei Medizinprodukten, die nicht mit dem Liquor cerebrospinalis in Kontakt kommen, beträgt der Grenzwert 20 EU pro Produkt, anderenfalls 2,15 EU pro Produkt. Nach der FDA-Richtlinie (1) ist der Grenzwert für flüssige Medizinprodukte der gleiche wie für Arzneimittel.

Manche Serinproteasen (z.B. Trypsin, aktivierte Blutfaktoren) verursachen falsch positive Ergebnisse, wenn sie nicht vor dem Test (beispielsweise durch Hitzebehandlung) inaktiviert werden. Gelbliche Materialien wie z.B. Tierserum, Albumin und Plasma können den chromogenen Assay auf pNA-Basis stören. Bei diesen Produkten den Assay mit Azokupplung (Associates of Cape Cod, Inc. Katalognummer CD060) verwenden. Übermäßige Trübung einer Probe kann gleichfalls den Test stören.

Erwartungswerte

Die Endotoxine in den Proben lassen sich im Bereich der Standard-Endotoxin-Konzentrationen, mit denen die Standardkurve erstellt wurde, quantitativ bestimmen. Falls zur Behebung von Hemm- oder Fördereffekten eine Verdünnung der Probe notwendig ist, erhöht sich die kleinste nachweisbare Endotoximenge entsprechend. Materialien biologischer Herkunft können selbst nach einer biochemischen Reinigung noch messbare Endotoxinspiegel aufweisen. Wasser, das durch Destillation, Umkehrosmose oder Ultrafiltration gewonnen wurde, kann Endotoxinspiegel unterhalb der Nachweisgrenze aufweisen, vorausgesetzt, der Purifikationsprozess arbeitet ordnungsgemäß und das Wasser wird nach der Produktion nicht kontaminiert.

Literatur

- Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
- Bacterial Endotoxins Test, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopaeial Convention, Rockville, MD.
- Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
- Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
- Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
- Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cacumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
- Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol. Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
- Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
- 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.
- Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
- 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.
- Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 43:13-18.
- Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
- Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125- 136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.
- Ebner, C., D. Kraft, E. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Ameobocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
- Tsuij, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
- Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
- Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <16>, USP, current revision, United States Pharmacopaeial Convention, Rockville, MD.

Unser erfahrenes Personal bespricht den LAL-Test in praktischer und theoretischer Hinsicht gerne mit Ihnen. Rufen Sie bei Fragen zum Umgang mit Pyrochrome® bitte an. Wir ersetzen jedes unserer Produkte, falls es nicht die in den Produktspezifikationen angegebene Leistung erbringen sollte. Setzen Sie sich vor einer Rücksendung bitte mit dem Kundendienst in Verbindung.