

Limulus-Amöbozyten-Lysat

PYROTELL® MTF

Hersteller: **ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED**
139 Normal St., South Duxbury P.O., Falmouth, MA 02575-1133

Telefon: (508) 540-3444
Gebührenfrei: (888) 395-2221
Fax: (508) 540-8680
Technischer Kundendienst: (800) 848-3248
Kundendienst: (800) 525-8378

PN000858 rev6 04. Jan. 2019

Pyrotell® Multitestfläschchen

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

Der *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-(LAL-)Test kann anstelle des USP Pharmacopeia-(USP-)Pyrogentests (Kaninchentest) als Endproduktprüfung von „injizierbaren Humanarzneimitteln (einschließlich biologischer Produkte), injizierbaren Tierarzneimitteln und Medizinprodukten“ verwendet werden. Der LAL-Test wird für die Quantifizierung von Endotoxinen in Ausgangsstoffen für die Produktion, einschließlich Wasser, sowie für die In-Prozess-Überwachung des Endotoxingehalts empfohlen. Der USP-Test auf bakterielle Endotoxine (1) ist der offizielle, in den spezifischen Monografien der USP angegebene Test.

Zusammenfassung des Tests

Limulus-Amöbozyten-Lysat ist ein wässriger Extrakt von Blutzellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*). Der LAL-Test wird durchgeführt, indem 0,1 mL rekonstituiertes Pyrotell 0,1 mL der Testprobe in einem 10 x 75 mm großen, entpyrogenisierten Reaktionsröhrchen aus Kalknatronglas zugegeben werden. Die Reaktionslösung wird gründlich vermischt und umgehend für 60 ± 2 Minuten bei 37 ± 1 °C in einen Trockenblockinkubator oder in ein nicht-zirkulierendes Wasserbad gestellt. Am Ende der Inkubationszeit wird das Röhrchen aus dem Inkubator herausgenommen und um 180° gedreht. Hat sich ein Gel gebildet, das nach dem Umdrehen um 180° auf dem Boden des Reaktionsröhrchens intakt bleibt, ist der Test positiv. Die Endotoxinkonzentration im Röhrchen ist größer oder gleich der Sensitivität von Pyrotell. Alle anderen Zustände des Reaktionsgemischs stellen ein negatives Testergebnis dar, das bedeutet, dass die Endotoxinkonzentration unterhalb der Sensitivität von Pyrotell liegt. Auch wenn sich ein Gel gebildet hat, dieses aber beim Umdrehen aufreißt oder zusammenfällt, ist der Test negativ. Der LAL-Test ist schnell, spezifisch, einfach durchzuführen und hoch sensitiv. Pyrotell kann mithilfe der Festgel-Technik bereits so geringe Konzentrationen wie 0,03 Endotoxin-Einheiten (EE) pro mL nachweisen.

Geschichte und biologisches Prinzip

Howell beschrieb die Gerinnung von *Limulus*-Blut bereits 1885 (3). In den 1950er Jahren entdeckte Bang am Marine Biological Laboratory in Woods Hole (Massachusetts, USA), dass die Gerinnung von *Limulus*-Blut durch gramnegative Bakterien ausgelöst wird (4). Levin und Bang stellten später fest, dass es sich dabei um eine Enzymreaktion handelt und dass die Enzyme in Körnchen in den Amöbozyten vorliegen (5). Sie konnten nachweisen, dass die Gerinnung durch eine besondere strukturelle Komponente der bakteriellen Zellwand ausgelöst wird, die als Endotoxin oder Lipopolysaccharid bezeichnet wird (6). Man geht aktuell davon aus, dass die Reaktion, die zur Gerinnsbildung führt, aus einer Kaskade enzymatischer Aktivierungsschritte besteht. Die vollständige Reaktion ist noch ungeklärt, hingegen ist der letzte Schritt gut erforscht. Gerinnungsprotein (Koagulogen) wird durch aktiviertes Gerinnungsenzym gespalten; die unlöslichen Spaltprodukte koaleszieren durch Ionenwechselwirkung und bilden so die Gelmatrix. Weitere Informationen zur LAL-Reaktion und ihren Anwendungsmöglichkeiten finden sich in der Literatur (7, 8, 9).

Reagenz

Pyrotell *Limulus*-Amöbozyten-Lysat (LAL) ist in lyophilisierter Form in Fläschchen mit 2 mL bzw. 5 mL verpackt.

Associates of Cape Cod, Inc. bietet individuelle Pyrotell-Chargen in Sensitivitäten zwischen 0,03 EE/mL und 0,5 EE/mL, basierend auf dem USP-Endotoxin-Referenzstandard (auch Referenzstandard-Endotoxin oder RSE genannt). Die Sensitivität (λ) ist die niedrigste Konzentration an RSE, bei der sich unter Standardbedingungen eine feste Gelschicht bildet. Die Chargensensitivität (EE/mL) ist auf den Fläschchen- und Verpackungsetiketten aufgedruckt. Bei der Bestellung sollte die gewünschte Sensitivität angegeben werden.

Pyrotell nur für die In-vitro-Diagnostik verwenden. Nicht zum Nachweis einer Endotoxämie verwenden. Die Toxizität für dieses Reagenz wurde nicht ermittelt; daher ist beim Umgang mit Pyrotell Vorsicht geboten.

Zur Rekonstitution von Pyrotell wie folgt vorgehen:

- Leicht gegen das Fläschchen mit Pyrotell klopfen, damit loses LAL zum Boden des Fläschchens rieselt. Den Crimpverschluss entfernen und das Vakuum durch Abziehen des grauen Stopfens aufheben. Eine Kontamination der Öffnung des Fläschchens vermeiden. Nicht durch den Stopfen injizieren oder ihn wiederverwenden. Eine geringe Restmenge LAL am Stopfen hat keine Auswirkungen auf den Test. Das Fläschchen bei Nichtgebrauch mit Parafilm „M“[®] (American National Can™) abdecken.
- Pyrotell mit LAL-Reagenzwasser (LRW, siehe „Testreagenzien“) oder einem kompatiblen Puffer (Associates of Cape Cod, Inc.) rekonstituieren. Wie auf dem Fläschchenetikett angegeben, 2,0 mL bzw. 5,0 mL zugeben. Das gefriergetrocknete LAL-Kügelchen beginnt sich binnen weniger Minuten aufzulösen. Vor Gebrauch den Inhalt des Fläschchens vorsichtig vermischen, um die Homogenität zu gewährleisten. Wenn zu heftig gemischt wird, kann es zu übermäßiger Schaumbildung kommen, was die Sensitivität beeinträchtigen kann.

Aufwahrungsbedingungen

Gefriergetrocknetes Pyrotell ist relativ wärmestabil und behält bei gekühlter Aufbewahrung seine volle Aktivität bis zum auf dem Fläschchenetikett angegebenen Verfallsdatum. Das Produkt nach Erhalt bei einer Temperatur von -20 °C bis +8 °C lagern. Bei Temperaturen unter -20 °C schrumpft der Stopfen, was Vakuumverlust und eine mögliche Kontamination von Pyrotell zur Folge hat. Temperaturen von über 37 °C können zum schnellen Verderb des gefriergetrockneten Pyrotells führen. Dies wird durch einen Verlust der Sensitivität und eine ausgeprägte Gelbfärbung des Produkts angezeigt. Pyrotell wird auf Kühllakus in isolierten Behältern versandt, um es vor hohen Temperaturen zu schützen.

Rekonstituiertes Pyrotell ist für gewöhnlich klar und leicht schillernd. Gelegentlich kann eine Charge eine leichte, gleichmäßige Trübung aufweisen. Das Vorhandensein von kleinen Fasern oder Strähnen deutet nicht auf eine Kontamination hin und beeinträchtigt die Aktivität nicht; Ausflockung oder eine deutliche Gelbfärbung zeigt hingegen Verfall an.

Rekonstituiertes Pyrotell ist weniger stabil als das gefriergetrocknete Produkt; die Fläschchen können bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Rekonstituiertes Pyrotell kann einmal eingefroren werden. Das Produkt behält seine Aktivität drei Monate lang, sofern es unmittelbar nach der Rekonstitution eingefroren und bei -20 °C oder darunter aufbewahrt wird. Nach dem Auftauen gelten die gleichen optischen Kriterien für Qualität wie nach der ersten Rekonstitution.

Probenentnahme und -vorbereitung

Die Proben sind aseptisch in nicht-pyrogene Behälter zu entnehmen. Empfohlen werden wiederverwendete, entpyrogenisierte Glasartikel oder sterile Einwegartikel aus Polystyren-Kunststoff, um die Adsorption von Endotoxinen an den Behälteroberflächen zu minimieren. Kunststoffbehälter sind nicht grundsätzlich frei von nachweisbaren Endotoxinen. Auch kann eine extrahierbare Substanz bei bestimmten Typen den LAL-Test stören. (Zufällig aus einer Charge ausgewählte) Behälter können mit einer kleinen Menge LRW (eine Stunde lang bei Raumtemperatur)

ausgespült werden und das Spülwasser kann anschließend als Probe getestet werden, um zu prüfen, ob die Charge geeignet ist.

Der pH-Wert des Reaktionsgemischs (Pyrotell mit zugefügter Probe) sollte bei 6 bis 8 liegen. Den pH-Wert der Probe mit HCl oder NaOH (frei von nachweisbaren Endotoxinen) oder einem kompatiblen Puffer einstellen (siehe Punkt 3 unten). Konzentrierte HCl bzw. NaOH mit LRW auf Äquivalentkonzentrationen verdünnen, die bei Einstellung nicht zu einer signifikanten Verdünnung der Testprobe führen. Nicht den pH-Wert von ungepufferter Kochsalzlösung oder Wasser einstellen.

Substanzen, die Proteine denaturieren, Kationen chelatisieren, Endotoxine binden oder den hydrophoben Status von Endotoxinen ändern, können den Test stören. Die Störung kann als Wiederfindung einer gegenüber dem erwarteten Wert signifikant höheren oder niedrigeren Endotoxinmenge nach Zugabe einer bekannten Menge Standardendotoxin zur Probe festgestellt werden (siehe „Einschränkungen des Verfahrens“). In den meisten Fällen reduziert eine Verdünnung der Probe die Konzentration und Aktivität der Störsubstanzen, während weiterhin gültige Testergebnisse erzielt werden. Geeignete Kontrollen und Verdünnungsschemata werden unter „Testverfahren“ besprochen.

Die Proben sollten so bald wie möglich nach der Entnahme getestet werden. Es kann ratsam sein, unsterile Proben, die vor dem Test aufbewahrt oder transportiert werden sollen, einzufrieren. Proben, für die eine niedrige Endotoxinkonzentration (unter 1 EE/mL) erwartet wird, sollten auf Endotoxinverlust während der Aufbewahrung getestet werden.

Testverfahren

Testreagenzien

1. *Pyrotell Multitestfläschchen* (siehe Beschreibung und Rekonstitutionsverfahren weiter oben).

2. *LRW*, gehört nicht zum Lieferumfang von Pyrotell; separat zu bestellen. Gefriergetrocknetes Pyrotell muss mit Wasser rekonstituiert werden, das im LAL-Test kein nachweisbares Endotoxin aufweist. Empfohlene Bezugsquellen sind Associates of Cape Cod, Inc. oder ein steriles Wasser für Injektionszwecke oder für die Irrigation (WFI) gemäß USP (ohne Bakteriostat). Der Endotoxin-Grenzwert für USP-WFI beträgt 0,25 EE/mL; daher kann WFI im Test mit einem Pyrotell mit höherer Sensitivität nachweisbares Endotoxin enthalten. Um eine neue Charge Wasser als LRW zu deklarieren, muss Pyrotell rekonstituiert werden und sind Verdünnungen von Standard-Endotoxin mit der neuen Charge Wasser anzusetzen, um die Sensitivität von Pyrotell zu bestätigen. Wenn die Test-Sensitivität der Charge bestätigt wurde und die Negativkontrolle keine erhöhte Viskosität und keine Ausflockung zeigt, ist das Wasser zum Gebrauch geeignet. Das LRW zur Rekonstitution von Pyrotell und Endotoxinstandards und zur Verdünnung von Endotoxinstandards und Testproben verwenden.

3. *Puffer*, gehört nicht zum Lieferumfang von Pyrotell; bei Bedarf separat zu bestellen. Pyrosol Puffer (Best.-Nr. BR051 oder BC554) oder Glucashield™ Puffer (Best.-Nr. GB051) können anstelle von LRW zur Rekonstitution von Pyrotell verwendet werden, um Probleme mit dem pH-Wert der Proben oder Störungen durch Glukane zu beseitigen.

4. *Standard-Endotoxin*, gehört nicht zum Lieferumfang von Pyrotell; separat zu bestellen. Kontroll-Standard-Endotoxin (KSE), zu beziehen von Associates of Cape Cod, Inc., wird verwendet, um die Sensitivität von Pyrotell zu bestätigen, Produkte zu validieren und Hemmungskontrollen anzusetzen. Jedes Fläschchen enthält ein abgemessenes Endotoxingewicht. USP Endotoxin-Referenzstandard kann von der U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. bezogen werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Rekonstitution und Aufbewahrung von Standard-Endotoxinen befolgen. KSE-Chargen weisen beim Test mit verschiedenen Chargen von Pyrotell eventuell unterschiedliche Potenzen (EE/ng) auf. Ein Analysezertifikat für die Potenz eines KSE bei einer bestimmten Charge von Pyrotell kann angefordert werden.

Materialien und Ausrüstung (nicht geliefert)

- Reaktionsröhrchen*, 10 x 75 mm, entpyrogenisiert, Kalknatronglas (Best.-Nr. TS050). Einige Marken weisen bei bestimmten Pyrotell-Chargen hemmende Eigenschaften auf. Entpyrogenisierte Röhrchen sind von Associates of Cape Cod, Inc. zu beziehen.
- Nicht-zirkulierendes Wasserbad* oder Trockenblockinkubator (Best.-Nr. TH120) mit der Fähigkeit, eine Temperatur von 37 ± 1 °C aufrechtzuerhalten.
- Röhrchenständer* zum Aufnehmen und/oder Inkubieren der Reaktionsröhrchen.
- Pipetten*, Pipettierautomaten mit Pipettenspitzen oder Wiederholungspipettierer mit Spritzenzylindern aus Kunststoff. Sterile Einwegmaterialien werden empfohlen.
- Vortex-Mixer*.
- Parafilm „M“*[®]. Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist normalerweise nicht-pyrogen.
- Nicht-pyrogene Teströhrchen* mit ausreichendem Fassungsvermögen zum Ansetzen von Verdünnungen des Endotoxinstandards bzw. der Testprobe. Andere für Verdünnungen geeignete Behälter bitte dem Abschnitt „Probenentnahme und -vorbereitung“ entnehmen.
- Heißluftofen*, der 250 °C erreichen kann, zum Entpyrogenisieren von Glasartikeln. Die allgemein verwendeten Mindesteinstellungen für Dauer und Temperatur sind 30 Minuten bei 250 °C (2, 11).

Kontrollen

Um einen gültigen Test zu gewährleisten, sind Kontrollen unabdingbar. Empfohlene Verfahren werden ausführlich von FDA (1) und USP (2) erläutert.

1. Endotoxinkontrollen

a. **Endotoxinstandard-Reihe**. Für jeden Tag einen frischen Satz geeigneter Serienverdünnungen aus der Stamm-Endotoxinlösung ansetzen und jede Verdünnung nicht weniger als 30 Sekunden lang vortexen. Verdünnung so ansetzen, dass bei der fertigen Standardreihe die Sensitivität (λ) von Pyrotell von jeweils zweifachen Verdünnungen eingeschlossen wird. Es werden Konzentrationen von 2 λ , λ , 0,5 λ und 0,25 λ empfohlen, um die Sensitivität von Pyrotell zu bestätigen. So wenige Verdünnungen wie möglich mit dem entsprechenden Pipettierolumen verwenden, um die Genauigkeit zu maximieren.

b. Unter bestimmten Umständen können **Positivkontrollen** verwendet werden, wenn keine Standardkonzentrationsreihen vorhanden sind. Einzelheiten siehe FDA-Richtlinie (1) unter „Routine Testing of Drugs by the LAL Test“ (Routineprüfungen von Arzneimitteln mit dem LAL-Test). Die Konzentration der Positivkontrollen sollte 2 λ betragen.

c. **Positive Produktkontrollen** sind Hemmungskontrollen und bestehen aus der Probe bzw. Probenverdünnung, der Standardendotoxin zugesetzt wird. Die Endkonzentration des zugesetzten Endotoxins in der Testprobe sollte 2 λ betragen.

2. Negativkontrollen

Eine oder mehrere aus LRW bestehende Negativkontrollen sollten in jeder getesteten Probencharge mitgeführt werden. Während der Produktvalidierung oder bei Hemmungs-/Verstärkungstests (1, 2) wird die Probe, die zur Verdünnung des Standardendotoxins verwendet wird, ebenfalls als Negativkontrolle behandelt.

Vorbereitung der Proben für Grenzwert-Test oder Assay

Die Probe entweder auf die erforderliche Konzentration verdünnen, um einen Grenzwert-Test (Pass/Fail – Bestanden/Nicht bestanden) durchzuführen, oder einen Assay durchführen, indem eine Reihe von Konzentrationen getestet wird (Beispiele für beide Testarten

werden in „Ergebnisse und Interpretation“ gegeben). Verdünnungen können in Teströhrchen angesetzt werden und das Testvolumen wird anschließend in die Reaktionsröhrchen überführt oder die Verdünnungen werden direkt in den Reaktionsröhrchen angesetzt, sodass das Testvolumen (0,1 mL) im jeweiligen Röhrchen verbleibt. Die Verdünnung für einen Grenzwert-Test wird durch die Sensitivität von Pyrotell und den Endotoxin-Grenzwert für die Probe bestimmt. Erläuterungen und Berechnungen der minimalen gültigen Konzentration (mgK) und der maximalen gültigen Verdünnung (mgV) sind dem Abschnitt „Einschränkungen des Verfahrens“ oder der FDA-Richtlinie (1) zu entnehmen.

Testdurchführung

Eine **konsistente Technik** ist erforderlich, um befriedigende Ergebnisse zu erhalten.

1. Jedem Reaktionsröhrchen mit 0,1 mL Testprobe oder Kontrolle 0,1 mL rekonstituiertes Pyrotell zugeben. Dazu eine Messpipette (mit Teilstrichen von 0,1 mL), einen Pipettierautomaten oder einen Wiederholungspipettierer verwenden. Pyrotell zuerst der/den Negativkontrolle(n) und dann von der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration in jeder Testreihe zugeben, wenn Verschleppung ein Problem darstellen könnte. Empfohlen wird, für jeden Zugriff auf das Fläschchen mit Pyrotell eine frische Pipette bzw. Pipettenspitze zu verwenden. Den Röhrchenständer 20 bis 30 Sekunden lang kräftig schütteln, um ein gründliches Durchmischen zu gewährleisten. Wenn nur wenige Röhrchen zu bearbeiten sind, kann jedes 1 bis 2 Sekunden lang auf dem Vortex gemischt werden. Nicht ausreichendes Mischen ist eine häufige Ursache für unbefriedigende Testergebnisse.

2. Die Reaktionsröhrchen für die Dauer von 60 ± 2 Minuten in ein Wasserbad oder einen Wärmeblock mit einer Temperatur von 37 ± 1 °C stellen. Die Reaktion beginnt, wenn LAL der Testprobe zugegeben wird, läuft jedoch erst dann bei optimaler Geschwindigkeit ab, wenn das Gemisch 37 °C erreicht hat. Wenn eine große Anzahl von Proben parallel getestet wird, sollten die Tests in Gruppen eingestellt und in Intervallen gestartet werden, die das Ablesen innerhalb des Zeitlimits erlauben.

Die Reaktionsröhrchen während der Inkubationszeit nicht stören. Die gelbbildende Reaktion ist störanfällig und kann unwiderruflich beendet werden, wenn die Röhrchen angestoßen, hin- und herbewegt oder Erschütterungen ausgesetzt werden. Keine Wasserbäder mit Rührern oder anderen Vibrationsquellen verwenden. Die Röhrchen bis oberhalb der Oberfläche des Reaktionsgemisches eintauchen, aber nicht so tief, dass sie auf der Wasseroberfläche schwimmen oder sich im Ständer bewegen.

3. Die Reaktionsröhrchen nacheinander herausnehmen und auswerten. Die Röhrchen nicht trockenwischen oder beim Entnehmen gegen den Ständer stoßen. Röhrchen mit einer fließenden Bewegung um 180° drehen. Den Vorgang nicht auf halbem Weg unterbrechen, es sei denn, es ist offensichtlich, dass sich kein Gel gebildet hat. Ein positiver Test wird durch die Bildung eines Gels angezeigt, das beim Umdrehen des Röhrchens nicht in sich zusammenfällt.

Ergebnisse und Interpretation

Beispiele für Standard-Endotoxin-Reihen

Die Sensitivität von Pyrotell bestätigen und das Labor bzw. den Prüfer qualifizieren, indem ein LAL-Test an einer Reihe bekannter Standard-Endotoxin-Konzentrationen (1, 2) durchgeführt wird, die in angegebene Sensitivitätsspanne fallen (also 2λ , λ , $0,5\lambda$ und $0,25\lambda$). Im folgenden Beispiel beträgt die Sensitivität (λ) von Pyrotell 0,25 EE/mL:

Endotoxinkonzentration	Testergebnis
0,5 EE/mL (2λ)	+
0,25 EE/mL (λ)	+
0,125 EE/mL ($0,5\lambda$)	-
0,06 EE/mL ($0,25\lambda$)	-
LRW (Negativkontrolle)	-

Der Endpunkt dieses Assays ist als die niedrigste Konzentration von Endotoxin definiert, die einen positiven Test ergibt. Die angegebene Sensitivität von Pyrotell wird bestätigt, wenn der

Endpunkt λ plus oder minus eine zweifache Verdünnung ist. In diesem Beispiel beträgt die Konzentration von Endotoxin im letzten positiven Röhrchen in der Reihe 0,25 EE/mL oder λ ; somit ist die Sensitivität bestätigt. Der Test wäre gültig (Sensitivität bestätigt), wenn der Endpunkt zwischen 0,125 EE/mL und 0,5 EE/mL (Fehlertoleranz der Methode) läge. Um einen Endpunkt von 0,125 EE/mL anzuzeigen, muss der Gehalt 0,06 EE/mL in der Reihe vorhanden und negativ sein.

Wenn der Endotoxin-Assay repliziert wird, wird die Sensitivität als geometrischer Mittelwert (GM) der einzelnen Sensitivitäten angegeben:

$$GM = \text{Antilog} (\Sigma e/f)$$

wobei Σe = Summe der Log-Endpunkte und f = Anzahl der Replikatendpunkte ist.

Die LRW-Negativkontrolle sollte einen negativen Test ergeben. Kommt es bei der Negativkontrolle zu einer Gerinnung, sind LRW, Glasartikel oder Pyrotell kontaminiert. Das Gemisch sollte klar und seine Viskosität nicht erhöht sein. „Schneeflocken“ oder Ausflockung deuten auf eine Endotoxinkonzentration unterhalb der Pyrotell-Sensitivität hin.

Sind keine Endotoxin-Verdünnungsreihen vorhanden (1), kann auch eine **Positivkontrolle** bei den Tests mitgeführt werden. Die Positivkontrolle bei 2λ entspricht im oben aufgeführten Beispiel einem Gehalt von 0,5 EE/mL. Ist die Positivkontrolle negativ, liegt die Pyrotell-Sensitivität unter dem Zweifachen der angegebenen Sensitivität und der Test der Probe ist ungültig. Ein Verlust der Sensitivität kann darauf hindeuten, dass Pyrotell zerfallen ist, das Endotoxin Potenz eingebüßt hat (häufig aufgrund von Adsorption an die Behälteroberfläche) oder der Test nicht sachgemäß durchgeführt wurde.

Beispiel für einen Grenzwert-Test (Pass/Fail – Bestanden/Nicht bestanden)

Es ist möglich, eine Probenkonzentration mit einer bestimmten Sensitivität von Pyrotell zu testen und am Ergebnis zu erkennen, ob die Testprobe mehr oder weniger Endotoxin als ihr Grenzwert enthält. In diesem Beispiel beträgt die Konzentration der Probe 1 mg/mL und der gewünschte bzw. vorherbestimmte Endotoxin-Grenzwert für die Probe beträgt 3 EE/mg (siehe „Einschränkungen des Verfahrens“). Der Grenzwert, in EE/mL angegeben,

$$(3 \text{ EE/mg}) (1 \text{ mg/mL}) = 3 \text{ EE/mL.}$$

ist größer als die Sensitivität von Pyrotell (0,25 EE/mL), sodass die Probe verdünnt werden muss, damit ein Pass/Fail-Test durchgeführt werden kann. Die Verdünnung der Probe bestimmen, die ein „Pass (Bestanden)“ (<3 EE/mL) bzw. ein „Fail (Nicht bestanden)“ (≥ 3 EE/mL) ergibt, indem der Endotoxin-Grenzwert in EE/mL durch die Sensitivität des LAL dividiert wird:

$$3 \text{ EE/mL} / 0,25 \text{ EE/mL} = 12.$$

Einen Teil Probe mit 11 Teilen LRW mischen, um eine Verdünnung von 1:12 zu erhalten, und den Test durchführen. Das Ergebnis zeigt an, ob die Probe den Test bei dem Grenzwert von 3 EE/mL bestanden hat. Positive Produktkontrollen lässt man in derselben Verdünnung wie die Probe mitlaufen, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Beispiel eines Probenassays

Endotoxin wird in einem Assay quantifiziert, indem der Endpunkt in einer Probenverdünnungsreihe bestimmt wird. Im Beispiel unten wird die Probe mit LRW verdünnt und die Verdünnungen in der Tabelle werden getestet; λ ist 0,25 EE/mL. Die Ergebnisse werden als positiv oder negativ verzeichnet.

Probenverdünnung	Testergebnis
unverdünnt	+
1:2	+
1:4	+
1:8	-
1:16	-
1:32	-
Negativkontrolle	-

Um die Endotoxinkonzentration in der Probe zu berechnen, wird die Pyrotell-Sensitivität (λ) mit dem Kehrwert der Verdünnung am Endpunkt multipliziert:

$$\text{Konz.} = (\lambda)(4/1) = (0,25 \text{ EE/mL})(4) = 1 \text{ EE/mL.}$$

Die Konzentration bei Replikat-Assays wird als geometrischer Mittelwert angegeben.

Eine **positive Produktkontrolle** (Probe gespikt mit 2λ Standard-Endotoxin) muss vorhanden sein und positiv ausfallen, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Wenn die positive Produktkontrolle negativ und die Positivkontrolle positiv ist, stört (hemmt) die Probe den LAL-Test. Die Probe sollte noch einmal in einer höheren Verdünnung getestet werden (die mgV nicht überschreiten; siehe „Einschränkungen des Verfahrens“).

Einschränkungen des Verfahrens

Das Verfahren wird durch die Fähigkeit der Probe, den LAL-Test zu hemmen oder zu verstärken, eingeschränkt. Wenn das Verfahren nicht bei einer Probenkonzentration validiert werden kann (1, 2), die über der minimalen gültigen Konzentration (mgK) liegt, kann der LAL-Test nicht als Ersatz für den USP-Pyrogentest dienen. Die mgK wird wie folgt berechnet:

$$\text{mgK} = \frac{(\lambda) (\text{Probendosis})}{(\text{Endotoxintoleranz-Grenzwert})}$$

wobei λ in EE/mL, die Probendosis in Einheiten pro kg Körpergewicht und der Endotoxintoleranz-Grenzwert in EE/kg angegeben werden.

Die maximale gültige Verdünnung (mgV) ist die Probenverdünnung, die die mgK enthält (1). Sie ist die Ausgangs-Probenkonzentration dividiert durch die mgK.

Der Endotoxintoleranz-Grenzwert (1) beträgt für Arzneimittel, die intrathekal verabreicht werden, 0,2 EE/kg und für alle anderen Parenteralia 5 EE/kg. Der Grenzwert für Medizinprodukte wird pro mL eines Extraktions- bzw. Spülvolumens angegeben, das gemäß der FDA-Richtlinie (1) hergestellt wird. Für Medizinprodukte, die mit Liquor in Kontakt kommen, beträgt der Grenzwert 0,06 EE/mL; für alle anderen Medizinprodukte sind es 0,5 EE/mL. Der Grenzwert für flüssige Medizinprodukte ist der gleiche wie für Arzneimittel.

Trypsin verursacht ein falsch-positives Ergebnis, sofern es nicht vor dem Test durch Wärmebehandlung denaturiert wird. Materialien wie Blut, Serum und Plasma sollte vor dem Test behandelt werden, damit Hemmstoffe inaktiviert werden (12).

Erwartete Werte

Endotoxin kann quantifiziert werden, wenn die Konzentration größer oder gleich der Pyrotell-Sensitivität ist. Materialien biologischer Herkunft können selbst nach einer biochemischen Reinigung noch einen messbaren Endotoxingehalt aufweisen. Durch Destillation, Umkehrosmose oder Ultrafiltration hergestelltes Wasser kann einen Endotoxingehalt unterhalb der Nachweisgrenze aufweisen, sofern das Reinigungsverfahren korrekt arbeitet und das Wasser nach der Herstellung nicht kontaminiert wird.

Spezifische Leistungsmerkmale

Die Fehlerbreite der Festgel-Methode beträgt plus oder minus die zweifache Verdünnung am Endpunkt des Assays.

Bibliographie

1. Test auf bakterielle Endotoxine, aktuelle USP.
2. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
3. 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.

4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.

5. 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.

6. 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.

7. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.

8. 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.

9. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.

10. 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.

11. 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.

Unser erfahrenes Personal bespricht die praktischen und theoretischen Aspekte des LAL-Tests gerne mit Ihnen. Bitte rufen Sie uns bei Problemen mit der Anwendung von Pyrotell an. Wir ersetzen Ihnen all unserer Produkte, deren Leistung nicht den Produktspezifikationen entspricht. Sie müssen uns über die Rücksendung von Produkten vorab benachrichtigen.