

Limulus-Amöbozyten-Lysat

PYROTELL®-T

Hersteller: ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
129 Bennett St., Suite 100 Drive E., Falmouth, MA 02536 USA
Telefon: (508) 540-3444
Gebührenfrei: (888) 395-2221
Fax: (508) 540-8680
Technischer Support: (800) 848-3248
Kundendienst: (800) 525-8378

PN000845-de rev6 April 2017

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

Pyrotell®-T *Limulus*-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Reagenz ist bestimmt für den Nachweis und die Quantifizierung *in vitro* von Endotoxin in der Endproduktprüfung von humanmedizinischen injizierbaren Arzneimitteln (einschließlich biologischen Produkten), veterinärmedizinischen injizierbaren Arzneimitteln und Medizinprodukten. Es kann außerdem zur Prüfung von in der Produktion eingesetzten Rohstoffen (einschließlich Wasser) und Komponenten sowie für die Prozessüberwachung des Endotoxinpiegels verwendet werden. Der USP-Test auf bakterielle Endotoxine (1) ist der offizielle, in den spezifischen Monographien der USP angegebene Test. Pyrotell®-T nur für die *In-vitro*-Diagnostik verwenden. Pyrotell®-T ist nicht für den Nachweis von Endotoxinen in klinischen Proben oder für die Diagnose einer Krankheit bei Menschen oder Tieren bestimmt.

Zusammenfassung des Tests

Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) ist ein wässriger Extrakt der Blutzellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*). Bei Anwesenheit von Endotoxinen trübt sich LAL und bildet unter geeigneten Bedingungen einen festen Gel-Clot. Der turbidimetrische LAL-Test wird durchgeführt, indem ein bestimmtes Volumen Pyrotell®-T zu einem bestimmten Probenvolumen gegeben und das Reaktionsgemisch bei 37 °C inkubiert wird. Je höher die Endotoxinkonzentration in der Probe ist, desto schneller bildet sich die Trübung. Die Endotoxinkonzentration lässt sich in zwei verschiedenen Verfahren anhand der Trübung quantifizieren.

Bei der kinetischen turbidimetrischen LAL-Methode wird entweder die Rate des Anstiegs der Trübung oder die Zeit bis zum Erreichen einer bestimmten Trübung (die Anfangszeit) ermittelt. Eine höhere Endotoxinkonzentration bewirkt eine kürzere Anfangszeit. Der Assay setzt Spezialinstrumente für die Inkubation von mehreren Proben bei einer kontrollierten Temperatur (normalerweise 37 °C) sowie zum Ablesen der optischen Dichte in regelmäßigen Abständen voraus. Standardkurven können erstellt werden, indem die logarithmische Anfangszeit über der logarithmischen Konzentration von Standardendotoxin aufgetragen wird. Sie dienen dann zur Berechnung der Endotoxinkonzentration in den Proben.

Die turbidimetrische LAL-Methode ist schnell, spezifisch, einfach durchzuführen und hoch sensitiv. Die Nachweisgrenze hängt davon ab, welche Methode und welche Instrumente eingesetzt werden, und lässt sich bis auf 0,001 Endotoxineinheiten (EU) pro ml senken.

Geschichte und biologisches Prinzip

Howell beschrieb die Gerinnung von *Limulus*-Blut bereits 1885 (2). 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 (3). Levin und Bang stellten später fest, dass es sich dabei um eine Enzymreaktion handelt und dass die Enzyme in Körnchen in den Amöbozyten vorliegen (4). Sie konnten nachweisen, dass die Gerinnung durch eine besondere strukturelle Komponente der bakteriellen Zellwand ausgelöst wird, die als Endotoxin oder Lipopolysaccharide bezeichnet wird (5). Man geht aktuell davon aus, dass die Reaktion aus einer Kaskade von Enzymaktivierungsschritten besteht. Die vollständige Reaktion ist noch ungeklärt, hingegen ist der letzte Schritt gut erforscht. Gerinnungsprotein (Koagulogen) wird von aktiviertem Gerinnungsenzym gespalten; die unlöslichen Spaltprodukte koaleszieren durch Ionenwechselwirkung und die Trübung des Reaktionsgemisches nimmt zu. Je höher die vorliegende Endotoxinmenge, desto schneller bildet sich die Trübung. Weitere Informationen zur LAL-Reaktion und ihren Applikationen finden sich in der Literatur (6, 7).

Reagenz

Pyrotell®-T ist gefriergetrocknet verpackt. Pyrotell®-T enthält einen wässrigen Extrakt der Amöbozyten von *L. polyphemus*, humanes Serumalbumin (Stabilisator), NaCl und weitere geeignete Ionen. Es werden keine Konservierungsmittel oder Puffer zugesetzt.

Pyrotell®-T ist nicht mit einer bestimmten Sensitivität ausgezeichnet. Die Sensitivität in einem bestimmten Test (Formelzeichen λ) ist die niedrigste Endotoxinkonzentration, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet wurde. Im Pyros Kinetix Flex® (Associates of Cape Cod, Inc.) liegt die Nachweisgrenze und somit der niedrigste mögliche Wert für λ bei 0,001 EU/ml.

Die Toxizität für dieses Reagenz wurde nicht ermittelt; daher ist beim Umgang mit Pyrotell®-T Vorsicht geboten.

Zur Rekonstitution von Pyrotell®-T wie folgt vorgehen:

1. Leicht auf das Fläschchen mit Pyrotell®-T klopfen, damit loses LAL zum Boden rieselt. Durch Anheben des grauen Stopfens das Vakuum aufheben. Eine Kontamination der Öffnung des Fläschchens vermeiden. Den Stopfen entfernen und entsorgen. Nicht durch den Stopfen injizieren oder ihn wiederverwenden. Eine geringe Menge LAL am Stopfen hat keine Auswirkungen auf den Test.
2. Pyrotell®-T mit LAL-Reagenz-Wasser (LRW, siehe unten) oder einem kompatiblen Puffer (erhältlich von Associates of Cape Cod, Inc.) rekonstituieren. Wie auf dem Fläschchenetikett angegeben 5 ml zugeben. Sobald sich das Reagenz aufgelöst hat, das Fläschchen vorsichtig schwenken, um Homogenität zu gewährleisten. Wenn zu heftig gemischt wird, kann es zu übermäßiger Schaumbildung kommen, was die Sensitivität beeinträchtigen kann. Das Fläschchen bei Nichtgebrauch mit Parafilm M® (Bemis Company Inc.™) abdecken.

Aufbewahrungsbedingungen

Gefriergetrocknetes Pyrotell®-T ist relativ wärmestabil und behält bei gekühlter Aufbewahrung seine volle Aktivität bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum. Das Produkt bei -20 °C bis +8 °C aufbewahren. Bei Temperaturen von unter -20 °C kann der Stopfen schrumpfen, was potenziell zu einem Verlust des Vakuums und zu einer Kontamination von Pyrotell®-T führen kann. Temperaturen von über 37 °C können einen rapiden Verfall des gefriergetrockneten Pyrotell®-T auslösen, der sich durch Sensitivitätsverlust und eine deutliche Gelbfärbung des Produkts bemerkbar macht. Pyrotell®-T wird auf Kühllakus in isolierten Behältern versandt, um es vor hohen Temperaturen zu schützen.

Rekonstituiertes Pyrotell®-T ist normalerweise durchsichtig und leicht schillernd. Gelegentlich kann eine Charge eine leichte und gleichförmige Trübung aufweisen. Das Vorhandensein von kleinen Fasern oder Strähnen deutet nicht auf eine Kontamination hin und beeinträchtigt die Aktivität nicht; flockiger Niederschlag oder eine deutliche Gelbfärbung zeigt hingegen Verfall an.

Rekonstituiertes Pyrotell®-T ist weniger stabil als das gefriergetrocknete Produkt; die Fläschchen können bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Rekonstituiertes Pyrotell®-T kann ein Mal eingefroren werden. Es 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 auf den Behälteroberflächen zu minimieren. Kunststoffbehälter sind nicht grundsätzlich frei von nachweisbaren Endotoxinen. Auch kann eine extrahierbare Substanz bei bestimmten Typen den LAL-Test stören. Durch Verwendung von Pyrosol® Puffer lassen sich Variationen aufgrund von Störungen durch Verbrauchsmaterialien häufig beseitigen. Laborartikel können auf ihre Eignung getestet werden, indem Behälter aus einer Charge zufällig ausgewählt und bei Raumtemperatur mit einem kleinen Volumen LRW eine Stunde lang ausgespült werden und das Spülwasser anschließend als Probe getestet wird. Das Spülwasser sollte deutlich weniger Endotoxine enthalten als die niedrigste vorgesehene Standardkonzentration. Außerdem sollte das Spülwasser den Test weder hemmen noch fördern, was anhand der Wiederfindung einer bekannten zugesetzten Endotoxinmenge festgestellt werden kann.

Der pH-Wert des Reaktionsgemisches sollte zwischen 6 und 8 liegen. Den pH-Wert der Probe mit HCl, NaOH oder Puffer (frei von nachweisbaren Endotoxinen) einstellen. Konzentrierte HCl bzw. NaOH mit LRW verdünnen und bei Äquivalentkonzentrationen verwenden, die nicht zu einer signifikanten Verdünnung der Testprobe führen. Wenn sich nach der pH-Einstellung ein Niederschlag in der Probe bildet, die Probe verdünnen (nicht über die mgV hinaus – siehe „Einschränkungen des Verfahrens“), bevor der pH-Wert eingestellt wird. Alternativ Pyrotell®-T mit einem kompatiblen Puffer (erhältlich von Associates of Cape Cod, Inc.) verdünnen und den pH-Wert des Reaktionsgemisches prüfen. Nicht den pH-Wert von ungepufferter Kochsalzlösung oder Wasser einstellen. Hier sei angemerkt, dass pH-Probleme eventuell durch eine einfache Verdünnung zu beseitigen sind.

Substanzen, die Proteine denaturieren, Ionen 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 EU/ml) erwartet wird, sollten auf Endotoxinverlust während der Aufbewahrung getestet werden.

Testverfahren

Testreagenzien

1. Pyrotell®-T (siehe Beschreibung und Rekonstitutionsverfahren weiter oben).
2. *LAL-Reagenz-Wasser* (LRW), gehört nicht zum Lieferumfang von Pyrotell®-T; separat zu bestellen. Gefriergetrocknetes Pyrotell®-T muss mit Wasser (oder einem kompatiblen Puffer, der von Associates of Cape Cod, Inc. erhältlich ist, siehe Punkt 3 weiter unten), das im LAL-Test kein nachweisbares Endotoxin aufweist, rekonstituiert werden. Empfohlene Bezugsquellen für das Wasser sind Associates of Cape Cod, Inc. oder ein handelsübliches steriles Wasser für Injektionszwecke (steriles WFI) gemäß USP ohne Bakteriostat oder Wasser für die Irrigation gemäß USP. Alle genannten können verwendet werden, sofern die Eignung zur Verwendung als LRW nachgewiesen wurde. Der Endotoxingrenzwert für steriles WFI gemäß USP beträgt lediglich 0,25 EU/ml; daher kann steriles WFI nachweisbare Endotoxine enthalten und ungeeignet sein.

Um zu zertifizieren, dass Wasser als LRW akzeptabel ist, muss es als Probe mit einer positiven Produktkontrolle (siehe Punkt 1.c. im Abschnitt „Kontrollen“) getestet werden. Zertifiziertes LRW zur Rekonstitution von Pyrotell®-T, zur Verdünnung von Standards und zum Ansetzen von Positivkontrollen verwenden (siehe Punkte 1.a. und 1.b. im Abschnitt „Kontrollen“). Aus den Anfangszeiten für die Standards eine Standardkurve erstellen. Der Korrelationskoeffizient sollte mindestens 0,980 betragen (Absolutwert). Die Endotoxinkonzentration des getesteten Wassers lässt sich mittels Extrapolation der Standardkurve unter die niedrigste Endotoxinkonzentration abschätzen und sollte geringer sein als die des niedrigsten Standards. Darüber hinaus sollte die Endotoxinkonzentration der positiven Produktkontrolle innerhalb von 50 % bis 200 % der Nennkonzentration des Endotoxinzusatzes liegen.

3. *Puffer*, gehört nicht zum Lieferumfang von Pyrotell®-T; bei Bedarf separat zu bestellen. Pyrosol Puffer (Best.-Nr. BC051 oder BC554) oder Glucashield™ Puffer (Best.-Nr. GB051) können anstelle von LRW zur Rekonstitution von Pyrotell®-T verwendet werden, um Probleme mit dem pH-Wert der Proben, Störungen durch Verbrauchsmaterialien oder Störungen durch Glukane zu beseitigen.
4. *Standardendotoxin*, gehört nicht zum Lieferumfang von Pyrotell®-T; separat zu bestellen. Control Standard Endotoxin (CSE), zu beschaffen bei Associates of Cape Cod, Inc., wird verwendet, um Standardkurven zu erstellen, Produkte zu validieren und Hemmungskontrollen anzusetzen. Jedes Fläschchen enthält ein gemessenes Endotoxingewicht. USP Endotoxin-Referenzstandard kann bei der U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. beschafft werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Rekonstitution und Aufbewahrung von Standardendotoxinen befolgen. CSE-Chargen weisen beim Test mit verschiedenen Chargen von Pyrotell®-T eventuell verschiedene Potenzen (EU/ng) auf. Wenn CSE verwendet wird, kann die Endotoxinkonzentration in EU/ml angegeben werden, wenn die Potenz einer bestimmten CSE-Charge mit der fraglichen Charge Pyrotell®-T ermittelt wurde (1, 2).

Materialien und Ausrüstung (nicht mitgeliefert)

1. *Reaktionsbehälter*. Die Wahl des Typs richtet sich nach dem für die Messung der Trübung verwendeten Instrument. Reaktionsröhrchen für das Pyros Kinetix Flex System sind entpyrogenierte Röhrchen aus Borosilikatglas der Größe 8 x 75 mm (TK100).
2. *Optisches Lesegerät*. Für die kinetische turbidimetrische Methode wird ein inkubierendes optisches Lesegerät wie z. B. das Pyros Kinetix Flex oder das BioTek ELx 808 IU (erhältlich von Associates of Cape Cod, Inc.) empfohlen.

3. **Röhrchen** zum Aufnehmen und/oder Inkubieren der Reaktionsröhrchen.
4. **Pipetten**, automatische Pipettierer mit Pipettenspitzen oder Wiederholungspipettierer mit Spritzenzylindern aus Kunststoff. Empfohlen werden von Störendotoxinen und Glukanen freie Einwegpipetten und -spitzen. Associates of Cape Cod, Inc. bietet das Pyroclear® Sortiment an, das mit einem Konformitätszertifikat ausgeliefert wird, aus dem hervorgeht, dass die Produkte frei von Störendotoxinen und Glukanen sind.
5. **Vortex-Mixer**.
6. **Parafilm M®**. Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist normalerweise nicht-pyrogen.
7. **Nicht-pyrogene Röhrchen** mit ausreichendem Fassungsvermögen zum Ansetzen von Verdünnungen des Endotoxinstandards bzw. der zu testenden Probe. Andere für Verdünnungen geeignete Behälter bitte dem Abschnitt „Probentnahme und -vorbereitung“ entnehmen.
8. **Heißluftofen**, der 250 °C erreichen kann, zum Entpyrogenisieren von Glasartikeln. Die allgemein verwendeten Mindesteinstellungen für Dauer und Temperatur sind 30 Minuten bei 250 °C (1,8,9).

Kontrollen

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

1. Endotoxinkontrollen

- a. **Endotoxinstandard-Reihe**. Für jeden Test einen frischen Satz Verdünnungen aus der Stamm-Endotoxinlösung ansetzen. Keine zu einem früheren Zeitpunkt angesetzten Verdünnungen verwenden, es sei denn, die Stabilität des betreffenden Konzentrationsbereichs wurde nachgewiesen. Verdünnungen in geometrischer Reihe ansetzen (z.B. zweifach, vierfach oder zehnfach verdünnt), um den erforderlichen Bereich der Endotoxinkonzentrationen zu erhalten. Zur Bestätigung der Leistung von Pyrotell®-T werden die Konzentrationen 1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 und 0,03125 EU/ml empfohlen. Die niedrigste Endotoxinkonzentration einer Standardreihe ist die Nachweisgrenze für diesen Einzeltest und wird mit λ bezeichnet. Um die erforderliche Standardreihe zu erstellen, so wenige Verdünnungen wie möglich mit geeigneten Pipettenvolumina verwenden, um die Genauigkeit zu maximieren.
- b. **Eine Positivkontrolle** (eine einzige Standardendotoxin-Konzentration) sollte mitgeführt werden, falls die Standardreihe (siehe a. weiter oben) nicht ebenso wie die positiven Produktkontrollen (siehe c.) angesetzt wird. Eine Konzentration von 4λ eignet sich für Standardkurven, die aus 4, 5 oder 6 zweifachen Verdünnungen des Standardendotoxins erstellt werden (z. B. $4\lambda = 0,125$ EU/ml für die in Abschnitt a. weiter oben angegebene Standardreihe). In Situationen mit einem Verdünnungsschritt über 2 sollte die Konzentration der Positivkontrolle der eines Standards aus der Mitte der Standardkurve entsprechen. Zum Beispiel eignet sich ein Wert von 0,1 EU/ml für Positivkontrollen, die mit einer Standardreihe aus den Konzentrationen 0,001, 0,01, 0,1 und 1,0 EU/ml mitgeführt werden sollen. Falls keine Standardreihe im Test mitgeführt wird, muss eine Positivkontrolle mitgeführt werden, um zu bestätigen, dass die Parameter einer früheren Standardkurve zur Berechnung der Endotoxinkonzentrationen verwendet werden können. Einzelheiten siehe FDA-Richtlinie (1) und vorläufige Leitlinie (2) unter „Routine Testing of Drugs (or Devices) by the LAL Test“ (Routineprüfungen von Arzneimitteln (oder Medizinprodukten) mit dem LAL Test).

- c. **Positive Produktkontrollen** sind Hemmungs-/Förderungskontrollen und bestehen aus der Probe bzw. Probenverdünnung, der Standardendotoxin zugesetzt wird. Die Konzentration des Endotoxinzusatzes in der Testprobe sollte der Positivkontrolle entsprechen. Zur Auswahl der geeigneten Endotoxinkonzentration für die positive Produktkontrolle siehe Abschnitt b. weiter oben. Der Endotoxinzusatz wird auch als „Spike“ bezeichnet.

2. Negativkontrollen

Aus LRW bestehende Negativkontrollen sollten in jedem Test mitgeführt werden.

Probenvorbereitung - Ermittlung der Testverdünnung

Wenn bereits ein Testprotokoll für den zu testenden Probentyp besteht, die notwendige Verdünnung für den Assay ansetzen und entsprechend den Anweisungen weiter unten unter „Testdurchführung“ fortfahren. Wenn noch kein Testprotokoll für den Probentyp besteht, eine Reihe zehnfacher Verdünnungen der Probe ansetzen. Die maximale gültige Verdünnung (mgV) des Produkts höchstens um den Faktor 10 überschreiten. [Zur Erläuterung und Berechnung der mgV siehe „Einschränkungen des Verfahrens“ weiter unten oder USP (1)].

Geeignete Verdünnungen für alle Proben jeweils mit einer positiven Produktkontrolle ansetzen.

Testdurchführung

Eine konsistente Technik ist erforderlich, um befriedigende Ergebnisse zu erhalten. Alle Kontrollen und Proben sind (mindestens) zweifach zu bestimmen.

1. Testinstrumente nach Bedarf vorbereiten. Bei einem automatisierten System bedeutet dies normalerweise, dass Probenbeschreibungen eingegeben und Testparameter für die Proben eingestellt werden müssen.
2. Das geeignete Probenvolumen (Negativkontrolle, Endotoxinstandard, Testprobe, Positivkontrolle bzw. positive Produktkontrolle) in das Reaktionsröhrchen bzw. die Mikrotiterplatte geben. Für das Verhältnis 1:1 im Pyros Kinetix Flex 0,1 ml verwenden; für das Verhältnis 1:4 im Pyros Kinetix Flex ein Volumen von entweder 0,2 ml oder 0,4 ml verwenden.
3. Pyrotell®-T wie für den Vorgang geeignet zugeben. Bei Methoden, die einzelne Reaktionsröhrchen verwenden, ist das Timing der Reaktion in jedem Röhrchen entscheidend. Nacheinander zu jedem Reaktionsröhrchen Pyrotell®-T zugeben, ungefähr 2 Sekunden lang mischen und das Röhrchen in das inkubierende optische Lesegerät stellen. Für die Methode im Verhältnis 1:1 auf dem Pyros Kinetix Flex sowie die meisten anderen Methoden wird ein Volumen Pyrotell®-T von 0,1 ml zugegeben. Für die Methode im Verhältnis 1:4 auf dem Pyros Kinetix Flex bei 0,4 ml Probenvolumen 0,1 ml LAL zugeben. Bei 0,2 ml Probenvolumen ist ein Volumen von 0,05 ml LAL angemessen. Nicht ausreichendes Mischen ist eine häufige Ursache für unbefriedigende Testergebnisse. Pyrotell®-T kann am praktischsten mit einem Wiederholungspipettierer zugegeben werden. Empfohlen wird, für jeden Zugriff auf das Fläschchen mit Pyrotell®-T eine frische Pipette bzw. Pipettenspitze zu verwenden. Für andere Testprotokolle können andere Volumina Pyrotell®-T angemessen sein.
4. Sobald die Inkubation begonnen hat, das (die) Reaktionsröhrchen keinen Erschütterungen aussetzen. Der Labortisch, auf dem das Inkubator-/Lesegerät steht, muss frei von starken Vibrationen sein.
5. Den Test ablesen. Den Test so lange laufen lassen, bis alle Proben länger inkubiert wurden, als es dauert, bis die niedrigste Standardendotoxin-Konzentration die Anfangs-OD erreicht. Automatisierte Testsysteme beenden den Test normalerweise nach einer voreingestellten Dauer.

Ergebnisse

1. Vorläufige Berechnungen.

Die Zeit ermitteln, die die Proben benötigen, um einen bestimmten Schwellenwert der optischen Dichte (normalerweise 0,02 OD-Einheiten in einem Röhrchen-Lesegerät) zu erreichen, nachdem ggf. Datenkorrekturen vorgenommen wurden. Die optische Dichte muss relativ zu einem Anfangswert abgelesen werden, der als 0 OD-Einheiten verstanden wird. Dies übernimmt die Software. Die Zeit bis zum Erreichen des OD-Werts wird als **Anfangszeit** bezeichnet.

2. Eine Standardkurve erstellen.

Anhand einer linearen Regression der logarithmischen Anfangszeit über der logarithmischen Endotoxinkonzentration für die Standards eine Standardkurve erstellen. Die Gleichung für die Regressionslinie beschreibt die Standardkurve (es sei denn, dass die optionale polynomiale Regression gemäß der Beschreibung im folgenden Abschnitt gewählt wird).

Vorausgesetzt der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten für die Standardkurve beträgt mindestens 0,980 (siehe Punkt 2. unter „Auswertung“ weiter unten), kann zur Berechnung der Endotoxinkonzentrationen eine polynomiale (d.h. quadratische) Gleichung für die Regressionslinie verwendet werden.

3. **Die Endotoxinkonzentrationen berechnen.** Die Endotoxinkonzentrationen für alle Proben (einschließlich Standards und Kontrollen) anhand der Gleichung für eine Gerade berechnen:

$$Y = aX + b$$

wobei:

Y = logarithmische Anfangszeit

X = logarithmische Endotoxinkonzentration

a = Steigung der Geraden

b = Y-Achsenabschnitt.

Für das quadratische Modell lautet die Gleichung:

$$Y = a_1X + a_2X^2 + b$$

Wobei a_1 und a_2 die Steigungen von X und X^2 sind.

Diese Berechnungen werden im Allgemeinen von der Software des Endotoxin-Testsystems durchgeführt.

Auswertung

1. Damit ein Test gültig ist, muss die Endotoxinkonzentration der Negativkontrollen (geschätzt mittels Extrapolation der Standardkurve) unter der niedrigsten Standardkonzentration liegen.
2. Wenn der Test eine Standardkurve enthält, muss der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten für die Standardkurve größer oder gleich 0,980 sein.
3. Die mittlere gemessene Endotoxinkonzentration der Positivkontrollen muss innerhalb von 25 % der Nennkonzentration liegen. Bei einer Positivkontrolle von 0,125 EU/ml muss die gemessene Konzentration also zwischen 0,093(75) und 0,156(25) EU/ml liegen.
4. Den mittleren Bereich der Anfangszeiten für die Standardkurve ermitteln. Wenn z. B. die Anfangszeiten für zwei Replikate der höchsten Standardendotoxin-Konzentration 1079 und 1087 Sekunden betragen und die für die niedrigste Konzentration 1954 und 1968 Sekunden, ist der mittlere Bereich der Anfangszeiten 1083 bis 1961 Sekunden. Gültige Endotoxinkonzentrationen können nur für Proben berechnet werden, deren mittlere Anfangszeit im mittleren Bereich der Anfangszeiten für die Standardkurve liegt.

Zum Beispiel kann ein gültiges Ergebnis für eine unbekannt Probe angegeben werden, deren Anfangszeiten 1949 und 1965 Sekunden (Mittel = 1957 Sekunden) betragen, obwohl eines der Replikate außerhalb des Standardbereichs liegt.

5. Um nachzuweisen, dass die Probe die LAL/Endotoxin-Reaktion nicht signifikant stört, muss die gemessene Endotoxinkonzentration der positiven Produktkontrolle innerhalb von 50 % bis 200 % der Nennkonzentration des Endotoxinzusatzes liegen. Bevor festgestellt wird, ob der Zusatz innerhalb dieser Grenzwerte wiedergefunden wurde, die in der Probe (ohne Zusatz) gemessene Endotoxinkonzentration subtrahieren. Zum Beispiel muss, um als frei von signifikanten Störungen zu gelten, die gemessene Endotoxinkonzentration in einer positiven Produktkontrolle mit 0,125 EU/ml (nach Subtraktion etwaiger Endotoxine in der Probe ohne Zusatz) im Bereich 0,0625 - 0,25 EU/ml (50 % bis 200 % von 0,125 EU/ml) liegen. Wenn die gemessene Endotoxinkonzentration in der Probe ohne Zusatz 0,028 EU/ml beträgt und diejenige in der positiven Produktkontrolle 0,163 EU/ml, ist das auf den Zusatz zurückführbare Endotoxin 0,163 - 0,028 = 0,135 EU/ml. Damit liegt sie innerhalb des Bereichs und der Test dieser Probe ist, vorbehaltlich der Erfüllung anderer Anforderungen, gültig.

Einschränkungen des Verfahrens

Das Verfahren wird durch die Hemmungs- bzw. Förderungseigenschaften der getesteten Probe eingeschränkt. Wenn das Verfahren nicht bei einer Probenkonzentration validiert werden kann (1), 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 EU/ml, die Probendosis in kg Körpergewicht und der Endotoxintoleranz-Grenzwert in EU/kg angegeben werden.

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

Der Endotoxintoleranz-Grenzwert für parenterale Arzneimittel ist in den jeweiligen Monografien angegeben (1). Der Grenzwert für Medizinprodukte wird pro ml eines Extraktions- bzw. Spülvolumens angegeben, das gemäß der Beschreibung in USP (10) anhand der Grenzwerte für Produkte hergestellt wird. Für Medizinprodukte ohne Kontakt mit Liquor beträgt der Grenzwert 20 EU/Produkt; für Medizinprodukte mit entsprechendem Kontakt 2,15 EU/Produkt. 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, Albumin und Plasma können turbidimetrische Assays stören.

Erwartete Werte

Endotoxin in Proben kann im Bereich der Standardendotoxin-Konzentrationen, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet wurden, quantifiziert werden. Wenn die Probe verdünnt werden muss, um eine etwaige Hemmung bzw. Förderung zu beseitigen, steigt die geringste nachweisbare Endotoxinmenge entsprechend an. Materialien biologischer Herkunft können selbst nach einer biochemischen Reinigung noch messbare Endotoxinpiegel aufweisen. Durch

Destillation, Umkehrosiose oder Ultrafiltrierung hergestelltes Wasser kann einen Endotoxinspiegel unterhalb der Nachweisgrenze aufweisen, sofern das Reinigungsverfahren korrekt arbeitet und das Wasser nach der Herstellung nicht kontaminiert wird.

Bibliographie

1. Bacterial Endotoxin Test, chapter <85> United States Pharmacopeia (current version), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
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. 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.
8. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:710-714.
9. 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.
10. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 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[®]-T an.

Ein Exemplar der Gebrauchsanweisung für Pyrotell[®]-T in verschiedenen Sprachen steht auf www.acciusa.com zum Download bereit.