

Entwicklung und Evaluierung eines Pyrogentests mit menschlichem Blut

Stefan Fennrich, Matthias Fischer¹, Thomas Hartung, Peter Lexa², Thomas Montag-Lessing¹, Hans-Günther Sonntag², Markus Weigandt² und Albrecht Wendel
Universität D-Konstanz, ¹Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, ²Universität D-Heidelberg

Zusammenfassung

Zellen des Immunsystems, insbesondere Blutmonozyten und Makrophagen, schütten bei Kontakt mit pyrogenen (fieberezeugenden) Verunreinigungen Botenstoffe aus, die im Organismus die Fieberreaktion vermitteln. Ein neuer Pyrogentest macht sich genau diese Reaktion als Meßsystem zunutze: Die zu prüfenden Substanzen werden zusammen mit einer kleinen Blutmenge eines gesunden Spenders inkubiert. Anwesende Pyrogene machen sich dabei durch die Bildung von Interleukin-1 bemerkbar, das im ELISA bestimmt werden kann. Der in den Arzneibüchern beschriebene Kaninchen-Pyrogentest mißt den Anstieg der Körpertemperatur nach Injektion der Prüfsubstanz. Der neue Pyrogentest ist im Vergleich sensitiver, ökonomischer und mißt gleichzeitig die Reaktion der relevanten Spezies. Im Gegensatz zur gebräuchlichen *in vitro* Ersatzmethode, dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL), ist der Test nicht auf die Endotoxine Gram-negativer Bakterien beschränkt und wird auch nicht in gleichem Maße durch Endotoxin-bindende Substanzen wie Blutproteine gestört. Hier werden Zwischenergebnisse der laufenden Optimierung und Prävalidierung vorgestellt. Erste Resultate der Evaluierung für biologische und pharmazeutische Arzneimittel werden vorgestellt.

Summary: Evaluation and further development of a pyrogenicity assay based on human whole blood

When cells of the immune system, i.e. primarily blood monocytes and macrophages, come into contact with pyrogens (fever inducing contaminations) they release mediators transmitting the fever reaction within the organism. A new pyrogen test exploits this reaction for the detection of pyrogens: human whole blood taken from healthy volunteers is incubated in the presence of the test sample. In case of pyrogen contamination, the formation of interleukin-1 is induced, which is determined by ELISA.

According to the various pharmacopoeia, the rabbit pyrogen test determines the fever reaction following injection of a test sample. In comparison, the new whole blood assay is more sensitive, less expensive and determines the reaction of the targeted species. In contrast to the well established *in vitro* alternative, i.e. the limulus amoebocyte lysate assay (LAL), the blood assay is not restricted to endotoxins of Gram-negative bacteria and is not to the same extent disturbed by endotoxin-binding blood proteins.

Here, interim results of the ongoing optimisation and prevalidation are demonstrated. Preliminary data of the evaluation for biological and pharmaceutical drugs are presented.

Keywords: rabbit, safety testing, limulus test, fever, endotoxins

1 Einleitung und Fragestellung

Die frühzeitige Erkennung bakterieller Infektionen ist für den menschlichen Organismus überlebenswichtig. Evolutionär ist deshalb ein hochempfindliches Meßsystem entstanden, das Bakterien und andere Mikroorganismen an jenen Strukturen identifiziert, die sie nicht mit dem menschlichen Organismus teilen. Besonders wirkungsvoll reagiert das menschliche Immunsystem dabei auf Strukturen, die bei vielen Bakterienarten vorkommen; das bekannteste Beispiel hierfür sind die Endotoxine Gram-negativer Bakterien, die vermutlich die wirksamsten Immunstimuli überhaupt darstellen. Diese Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Bakterienwand lösen die Gesamtheit der Abwehrreaktio-

nen aus, die wir als Entzündung und Fieber kennen. Aufgrund ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Fieberinduktion werden Endotoxine und andere fieberauslösende Strukturen auch als Pyrogene zusammengefaßt (Pearson, 1985). Zellen des Immunsystems, insbesondere Blutmonozyten und Makrophagen, schütten bei Kontakt mit pyrogenen Verunreinigungen Botenstoffe aus, die im Organismus die Fieberreaktion vermitteln. Der bekannteste Vertreter dieser endogenen Pyrogene ist das Interleukin-1 β (IL-1 β).

Ein neuer Pyrogentest (Hartung und Wendel, 1995, 1996) macht sich genau diese Reaktion als Meßsystem zunutze: Die zu prüfenden Substanzen werden mit einer kleinen Blutmenge von einem gesunden Spender zusammen inkubiert. An-

wesende Pyrogene machen sich dabei durch die Induktion der Bildung von IL-1 β bemerkbar, das im ELISA bestimmt werden kann. Ähnliche Ansätze der Messung einer IL-1 β -Bildung durch Zellen als Pyrogentest sind bereits früher vorgeschlagen worden (Dinarello et al., 1984; Hansen und Christensen, 1990); die Problematik der Standardisierung dieser Systeme hat jedoch eine breite Anwendung bisher verhindert. Gefördert durch die Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET/BgVV, Berlin) wurde der Test seit seiner Erstbeschreibung weiter optimiert. Zur Zeit erfolgt eine Prävalidierung in Kooperation zwischen der Universität Konstanz, dem Paul-Ehrlich-Institut, Langen, und unter Beteili-

gung der Firmen Cnteon (Marburg), Biotest (Dreieich) und BioChem (Karlsruhe). Diese Prävalidierung, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF), prüft den Einsatz der Methode als Ersatz für den Kaninchen-Pyrogentest für Biologische Arzneimittel. Erste Erfahrungen im humanen Vollbluttest auf Pyrogene in dieser Produktgruppe konnten mit humanem Serumalbumin, Immunglobulinen, Impfstoffen und Blutgerinnungsfaktoren gemacht werden. Mit Ausnahme von einigen Impfstoffen und eingeschränkt Albumin sind diese Arzneimittel zur Zeit nur im Kaninchen-Pyrogentest prüfbar.

Eine weitere Prävalidierung für pharmazeutische Produkte, angeregt durch die Europäische Pharmakopöe und gefördert von Boehringer Mannheim, erfolgt derzeit an der Universität Heidelberg, Institut für Hygiene und Mikrobiologie. In Zusammenarbeit mit den Firmen Pharma Hameln, Hameln, Boehringer Mannheim, Mannheim, BioChem, Karlsruhe, und Phytos, Neu-Ulm, wird hierbei die Tauglichkeit des neuen Tests für die Prüfung von injizierbaren Medikamenten (Parenteralia) untersucht. Für diese Produkte kann heute bereits in großem Maße der Kaninchen-Pyrogentest durch eine Ersatzmethode, den Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test), ersetzt werden. Der Test auf Basis der Reaktion von menschlichem Blut verspricht jedoch, einige der Begrenzungen des LAL zu überwinden.

Von der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim, wird derzeit eine standardisierte Version des Tests als Kit auf den Markt gebracht, wodurch eine einheitliche Durchführung bei den verschiedenen Prüfstellen erleichtert wird. Insbesondere wird dadurch auch die internationale Verbreitung und Verfügbarkeit der Methode unterstützt. Im vorliegenden Artikel werden erste Resultate der komplexen Evaluierung und Prävalidierung zusammengefaßt, die die endgültige Ablösung des Kaninchen-Pyrogentests und Ergänzung des LAL zum Ziel hat.

2 Material und Methoden

Die Methodik des Pyrogentests wurde bereits beschrieben (Hartung und Wendel, 1995, 1996). Das Prinzip basiert auf einer Inkubation der zu testenden Probe mit

frisch gewonnenem Blut eines gesunden Spenders in pyrogenfreien Polypropylen-Gefäßen. Nach der mindestens sechsstündigen Inkubation bei 37°C erfolgt die Bestimmung von IL-1 β im ELISA (DPC Biermann, Bad Nauheim). Im Rahmen der Optimierung der Methode wurden folgende Veränderungen im Vergleich zur Erstbeschreibung vorgenommen: Es wird heparinisiertes Blut statt Citrat-Blut verwendet, wodurch der Heparin-Zusatz zum Verdünnungsmedium entfällt. Das zur Verdünnung verwendete Zellkulturmedium (RPMI 1640) wurde durch klinische Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) ersetzt. Auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet. Die Inkubation erfolgt jetzt wahlweise im Brutschrank, Wärmeschrank oder Thermoblock. Als Standardansatz schlagen wir eine Inkubation mit 1.000 μ l Kochsalzlösung, 100 oder 200 μ l Heparinblut und 100 μ l der zu prüfenden Lösung vor. Zum Nachweis von Endotoxinen erwies sich eine Inkubationszeit von 3 Stunden als ausreichend; es wurde jedoch beobachtet, daß es bei manchen Proben mit Nicht-Endotoxin-Pyrogenen erst zu einer verzögerten Freisetzung von IL-1 β kam, so daß eine Inkubation von mindestens sechs Stunden empfohlen wird, am zweckmäßigsten über Nacht. Auf das arbeitsaufwendige Zentrifugieren der Proben nach der Inkubation kann verzichtet werden.

Unter den genannten Bedingungen ist die spontane Freisetzung von IL-1 β minimal, d.h. unter der Nachweisgrenze käuflicher ELISAs. Eine signifikante Freisetzung von IL-1 β im Vergleich zum Rauschen des Blank muß als Ausdruck einer Aktivierung, d.h. einer Pyrogen-Verunreinigung der Probe bzw. des Inkubationsansatzes gewertet werden. Die bisher untersuchten biologischen Arzneimittel induzieren im hier vorgestellten Test in geringem Maße IL-1 β . Diese Induktion ist jedoch spezifisch für eine bestimmte Arzneimittelspezialität und verschiebt das Rauschen des Negativwertes lediglich etwas nach oben. Für biologische Arzneimittel kann also nicht pauschal gesagt werden, daß jede signifikante Freisetzung von IL-1 β Ausdruck einer Pyrogenverunreinigung ist, sondern es muß im Rahmen der Validierung ein arzneimittelspezifischer Wert gefunden werden.

Eine etwaige abnormale, zu starke oder zu schwache Reaktion eines Spenders

kann durch die Reaktion auf Referenzmaterialien, vorzugsweise Endotoxine, erfaßt werden; bei mittlerweile mehreren Hundert Blutspendern haben wir extreme Abweichungen jedoch noch nicht beobachtet.

2.1 Pyrogene

Es wurden Endotoxine von *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O55, *E. coli* O127, *Klebsiella pneumoniae* und *Shigella flexneri* eingesetzt (alle Sigma, Deisenhofen, *S. abortus equi* zusätzlich von Pyroquant, Walldorf). Die im Text erwähnten Lipoteichonsäuren wurden von Prof. W. Fischer, Erlangen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2 LAL-Test

Zur Einstellung der Standardpyrogene am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, und als Vergleichsmethode bei der Endotoxinprüfung von Parenteralia im Hygiene-Institut, Heidelberg, wurde der LAL-Gelierungstest von Pyroquant Diagnostik verwendet. Bei dieser Methode wird nach Zugabe einer endotoxinhaltigen Lösung zu einem aus dem Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*) gewonnenen Amöbozyten-Lysat eine Gelbildung des Gemisches ausgelöst. Die Bildung eines festen Gels, das nicht mehr zerfließen kann, zeigt ein positives Ergebnis auf Endotoxinverunreinigung an. Im negativen Fall findet keine Gelbildung statt.

An der Universität Konstanz wurde alternativ der chromogene COATEST Endotoxin (LAL, Endpunktmethode) verwendet (Chromogenix AB, Hämochrom, Essen). Über eine endotoxinvermittelte Enzymaktivierung und anschließende Substratumsatzung wird photometrisch ein Farbumschlag gemessen.

2.3 Test für biologische Arzneimittel

Der humane Vollbluttest wurde wie oben beschrieben angewandt. Als Endotoxinstandard wurde LPS von *Salmonella abortus equi* (Sigma), der im LAL-Gelierungstest eingestellt wurde, eingesetzt.

Folgende Präparate jeweils verschiedener Hersteller kamen zur Prüfung auf Pyrogene im Vollblut-Pyrogentest pur und in Verdünnungen von 1:10 bis 1:10.000 zum Einsatz: humanes Serumalbumin (5-25%), Immunglobulinpräparat (50 mg Protein pro ml), Blutgerinnungsfaktor VIII, Toll-

wutimpfstoff (inaktiviert) und Gelbfieberimpfstoff.

Es wurde zusätzlich jede Verdünnungsstufe mit 250 pg/ml LPS versetzt („spiked“).

2.4 Test für nicht biologische Parenteralia

Der humane Vollbluttest wurde wie oben beschrieben angewandt. Als Endotoxinstandard wurde das am Referenzstandard BRP-2 des Europäischen Arzneibuchs eingestellte Kontrollendotoxin NP-3 von *S. abortus equi* (Pyroquant, Walldorf) eingesetzt.

Folgende Gruppen von Fertigarzneimitteln wurden bisher im Vollblut-Pyrogentest als Probe eingesetzt: Glukoselösungen 2,5-50% mit/ohne Kochsalzzusatz, Ringerlösungen, Volumenersatzmittel auf Dextran- und Gelatinebasis, Aminosäuregemische, Wehenhemmer Fenoterol-Hydrobromid.

Für jedes Arzneimittel wurde durch Verdünnen und Zugabe von definierten Endotoxinmengen auf eine eventuell vorhandene Interferenz, d.h. Störung des Testsystems durch die Probe, geprüft, um Verdünnungen zu ermitteln, bei denen die Probe den Testansatz nicht stört. Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde zudem von „spiked“ Proben die LPS-Wiederfindung bestimmt. Verglichen wurden diese Ergebnisse mit in den internationalen Arzneibüchern existierenden Grenzwerten (ELC: *endotoxin limit concentration*), die auch im humanen Vollblut-Pyrogentest erreicht werden sollten.

3 Ergebnisse

Die Methode wurde wie im Methodenteil beschrieben vereinfacht. Die Freisetzung von IL-1 β in Gegenwart von Pyrogenen stellt sich dabei im wesentlichen als Schwellenreaktion dar (Abb.1), d.h. die verschiedenen Spender reagieren, wie hier für 32 Spender einer Blutbank gezeigt, in einem relativ scharf definierten Konzentrationsbereich für Endotoxine mit einem plötzlich einsetzenden, starken Anstieg der IL-1 β -Freisetzung. Eine weitere Erhöhung der LPS-Konzentration über mehrere Zehnerpotenzen führt dann nur noch zu einer geringen weiteren Steigerung der IL-1 β -Freisetzung (Daten nicht gezeigt).

Die Lagerbarkeit des Blutes bis zur Inkubation wurde systematisch geprüft: Bis

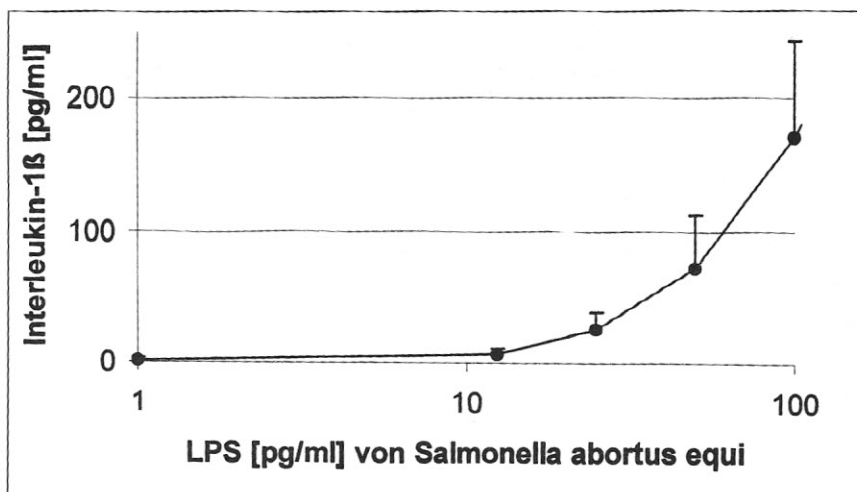


Abbildung 1: Interleukin-1 β Ausschüttung von Blut durch geringe Endotoxinkonzentrationen. Gezeigt sind die gemittelten Werte der Einzelversuche von 32 Blutspendern mit Standardabweichung des Mittelwertes. Aufgrund logarithmischer Darstellung wurde der Nullpunkt bei 1 pg/ml LPS aufgetragen.

zu acht Stunden bei Raumtemperatur war die Reaktion bezüglich ihrer Empfindlichkeit und der Menge der IL-1 β -Bildung unverändert. Bei Lagerung im Kühlschrank fiel die IL-1 β -Freisetzung dagegen bereits nach 4 h ab, wie auch bei Lagerung bei Raumtemperatur für mehr als 8 h. Bis zu 72 h war aber prinzipiell ein Signal bei wenig veränderter Empfindlichkeit detektierbar. Da jedoch das Antwortverhalten auf Nicht-Endotoxin-Pyrogene nicht abgeschätzt werden kann, sollte eine Inkubation weiterhin möglichst rasch nach Blutnahme erfolgen.

Neben dem LPS oder Endotoxin spielen als Fieberauslöser auch Nicht-Endotoxine eine relevante Rolle. Es wurde bereits gezeigt (Hartung und Wendel, 1995, 1996), daß verschiedene Vertreter wie hitzegetöteter *Staphylococcus aureus*, Muramylpeptid, Phorboläster oder Lipoteichonsäure von dem neuen humanen Vollblut-Pyrogentest detektiert werden können. In der Zwischenzeit wurden knapp 40 Lipoteichonsäuren von mehr als 20 Bakterienarten in dem Test als Pyrogene nachgewiesen (Publikation in Vorbereitung). Da der LAL-Test hier eine Beschränkung auf Endotoxin aufweist, könnte mit der neuen Methode ein weiteres sicherheitsrelevantes Spektrum an Pyrogenen erfaßt werden.

Der Vergleich der Schwellenreaktion, d.h. der Endotoxinkonzentration, die im jeweiligen Test erstmals positiv ist, im humanen Vollblut-Pyrogentest mit dem LAL-Test zeigt in Abbildung 2 C in Ab-

hängigkeit verschiedener Endotoxine (LPS) unterschiedliche Empfindlichkeiten. Ein bedeutsamer Unterschied tritt in bezug auf die Differenzierung verschiedener Endotoxine auf: So zeigen alle 10 Endotoxine in Abbildung 2 einen ähnlichen Schwellenwert von 100 pg oder 1 ng/ml LPS im LAL-Test, während im neuen Vollblut-Pyrogentest Schwellenreaktionen zwischen 1 pg und 10.000 pg differenziert werden können. Das heißt, daß mit der Vollblutmethode verschiedene Endotoxine mit wesentlich größerer Dynamik erfaßt werden.

Die 10 Endotoxine wurden gewählt, da für diese LPS-Schwellendosen der Fieberreaktion des Kaninchens bekannt sind (Dabbah et al., 1980; Tsuji et al., 1980; Greisman and Hornick, 1969; Keene et al., 1961; Weary et al., 1980; Pearson, 1985).

Im Gegensatz zum LAL stellt sich das Meßverhalten des Kaninchen-Pyrogentests und des humanen Vollblut-Pyrogentests sehr ähnlich dar. Abbildung 2A läßt für verschiedene Pyrogene eine deutliche Korrelation erkennen (Pearson $r=0,7258$ und $p=0,0175$, signifikant, für den Bluttest vs. Kaninentest bzw. $r=0,4505$ und $p=0,1913$, nicht signifikant, für den Bluttest vs. LAL in Abb. 2C): Verschiedene Lipopolysaccharide zeigen in beiden Tests ähnliche Potenzen, jedoch mit einer 10- bis 100-fachen höheren Empfindlichkeit im Vollbluttest, d.h. Kaninchen und Blutmodell reagieren auf dieselben Lipopolysaccharide besonders empfindlich bzw. unempfindlich. Es wird geschlossen, daß

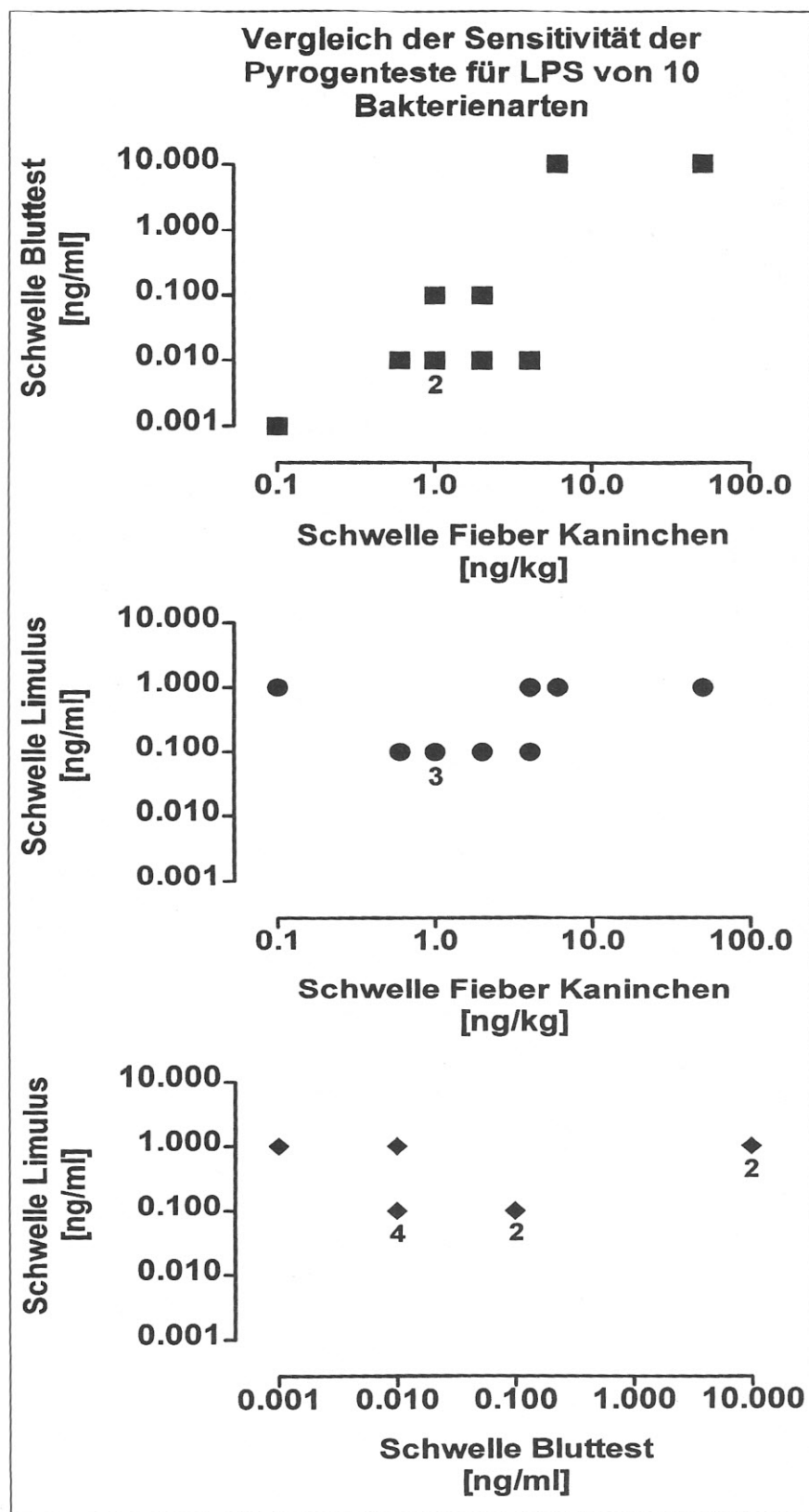


Abbildung 2: Vergleich der Empfindlichkeit der Pyrogentests für LPS von 10 Bakterienarten. Zehn Endotoxine verschiedener Bakterienspezies wurden in Zehnerschritten verdünnt im Blut-Pyrogentest und im chromogenen LAL getestet. Dargestellt sind die jeweils ersten positiven, d.h. IL-1 β -induzierenden Konzentrationen. Diese Daten wurden mit publizierten pyrogenen Schwellendosen im Kaninchen verglichen.

der Bluttest die Potenz verschiedener Endotoxine im Kaninchen im Gegensatz zum LAL weitgehend widerspiegelt.

Aus den anlaufenden Prävalidierungen in Langen und Heidelberg liegen erste Erfahrungen vor: Für die mit der neuen Methode getesteten biologischen Arzneimittel am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, ergaben sich folgende Ergebnisse:

► Es konnten sicher reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden mit einer Nachweisgrenze deutlich unter 50 pg/ml LPS. Vergleichende Messungen von LPS-Standardverdünnungen in physiologischer Kochsalzlösung und in Albumin zeigten eine Verstärkung der durch LPS induzierten IL-1 β -Ausschüttung durch das Albumin.

► Die Immunglobulinpräparate zeigten einen ähnlichen Verstärkungseffekt wie die Albumine, und die mit 50 pg/ml LPS versetzten Proben konnten sicher als pyrogenhaltig erkannt werden.

► Die inaktivierten Tollwutimpfstoffe zeigten keine spontane Freisetzung von IL-1 β im Vollblutpyrogentest. Die zugesetzten Standardpyrogene wurden zunächst maskiert, konnten aber nach einer 1:10 Verdünnung der Impfstoffe sicher erkannt werden.

► Die Gelbfieberimpfstoffe induzierten spontan eine Interleukinausschüttung im Vollblutpyrogentest bei einer Verdünnung von 1:10 bzw. 1:100. Eine Maskierung des zugesetzten Standardpyrogens war nicht erkennbar.

► Von den getesteten Blutgerinnungsfaktoren zeigten einzelne Präparate (Kaninchenpyrogentest negativ) eine spontane Interleukininduktion, die sich aber bei einer Verdünnung von 1:10 verlor. Zugesetztes Standardendotoxin konnte sicher erkannt werden. Eine im Kaninchenpyrogentest aufgetretene Pyrogenität eines Gerinnungsfaktors (Temperaturdifferenz über drei Tiere=3,65°C) wurde im humanen Vollbluttest sicher erkannt (IL-1 β -Ausschüttung fünfzigfach höher als die Negativwerte), wenn das Präparat unverdünnt eingesetzt wurde.

3.1 Ergebnisse für nicht-biologische Parenteralia

Mit der Einführung des LAL-Tests wurden zunehmend Höchstwerte für die Endotoxinbelastung von Parenteralia (ELC-Werte) in die Arzneibücher eingeführt. Diese Grenzwerte sollten auch durch den

Vollblut-Pyrogentest bestimmt werden können, um die Arzneimittelsicherheit nicht zu verringern.

Für die bisher untersuchten Fertigarzneimittel konnte gezeigt werden, daß der Vollblut-Pyrogentest eine hinreichende Empfindlichkeit besitzt, um Endotoxinkonzentrationen sogar unterhalb des jeweiligen ELC-Werts zu messen. Die Empfindlichkeit der bisherigen Versuche lag zwischen 25-100 pg/ml LPS von *S. abortus equi*. Eventuell auftretende Interferenzen wurden erkannt und konnten bisher durch Verdünnen der Probe aufgehoben werden (Tab.1). Verschiedene käufliche Parenteralia, die selbst im Blut-Pyrogentest negativ waren, wurden mit LPS entsprechend der ELC versetzt (Spike). Eine positive Reaktion wurde als Wiederfindung interpretiert. Der Test wies somit nach, daß bei allen Proben der Endotoxingehalt unter dem jeweiligen ELC-Wert lag und daß eine Verunreinigung in der Größe der ELC gefunden worden wäre. Anhand der Kombination verschiedener Probenverdünnungen und LPS-Konzentrationen wurde die Interferenz der Proben mit der LPS-Wiederfindung ermittelt.

Von den als interferenzfrei aufgeführten Arzneimitteln zeigten dabei eine noch akzeptable Verringerung der Empfindlichkeit, also eine leichte Inhibierung, Glukose 5% mit Natrium/Kalium, Ringerlösung, Dextran-Volumenersatzmittel und Fenoterol-Hydrobromid. In geringem Maße aktivierend wirkten Glukose 10% und Gelatine-Volumenersatzmittel (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Durch die geschilderten Vereinfachungen wurde die Praktikabilität der Methode sehr erleichtert. Der Verzicht auf Zellkulturmedium, Antibiotika- und Heparinzusatz reduziert erheblich die notwendigen Vorstufen auf Pyrogenfreiheit. Da physiologische Kochsalzlösung sehr leicht in pyrogenfreier Qualität verfügbar ist, müssen nur noch das Blutabnahmesystem und die Inkubationsgefäße vorgetestet werden. Da diese aber zumindest Endotoxin-frei erhältlich sind, treten derartige Probleme in der Praxis selten auf. Die Durchführung der Prüfungen in einem Thermoblock reduziert erheblich den apparativen Aufwand und die nötigen Kontrollen z.B. bei Durchführung unter GLP-Bedingungen (*Good Laboratory Practice*). Die Tatsa-

Tabelle 1: Erste Prüfergebnisse der Vollblutmethode für Parenteralia zur Detektion und Wiederfindung gesetzlicher ELC-Werte (endotoxin limit concentration)

Substanz	ELC [pg/ml]	Interferenz	Spike in Probe wiedergefunden
Glucose 2,5% NaCl 0,45%	100	keine	ja
Glucose 5%, Na, K	62,5	keine	n.b.
Glucose 10%	194	keine	ja
Glucose 50%	1250	pur, 1:4 verdünnt: ja 1:10 verdünnt: keine	n.b.
Ringerlösung	100	keine	ja
Polymerisierte Gelatine 0,3% NaCl, CaCl ₂ 0,45%	65	keine	ja
Dextran 40 10% NaCl 0,9%	25*	keine	ja
Aminosäuregemisch	400	pur: ja 1:4 verdünnt: keine	n.b.
Fenoterol-Hydrobromid	10416	keine	n.b.

* Zur Empfindlichkeitssteigerung wurde das Probenvolumen zu Lasten der physiologischen Kochsalzlösung im Inkubationsansatz verdreifacht.
n.b. = nicht bestimmt

che, daß eine Lagerung des Blutes bei Raumtemperatur über mehrere Stunden ohne Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit möglich war, macht es im allgemeinen problemlos möglich, Frischblut z.B. von einer Blutbank zu beziehen. Die verwendeten Mengen von 100 µl bzw. 200 µl pro Testansatz sind im allgemeinen unerheblich.

Der zentrale Diskussionspunkt bleibt eine mögliche Spendervariabilität. Obwohl wir in der Praxis solche Beobachtungen noch nicht gemacht haben, kann die Vielzahl von Einflußgrößen nicht kontrolliert werden. Im Augenblick können zwei Ansätze geboten werden, um dieses Problem zu lösen: Erstens kann die Prüfung mit Blut mehrerer Spender erfolgen; prinzipiell ist sogar die Mischung von Blut verschiedener Spender unabhängig von der Blutgruppe möglich (Daten nicht gezeigt). Da offenbar nur sehr selten abnorme Reaktionen auftreten, sollte damit eine ausreichende Sicherheit des Resultates zu erzielen sein; eine breite Prüfung in verschiedenen Spenderkollektiven steht zwar noch aus, aber die in Heidelberg mit Blut aus einer Blutspendenzentrale gewonnenen Daten (Abb.1) unterstützen diese Annahme. Zweitens kann die Empfindlichkeit eines Spenders durch Referenzpyrogene ermittelt werden. Der dabei mögliche Fall, daß eine ganze Messung retrospektiv verworfen werden muß, wenn sich der Spen-

der als zu wenig- oder zu stark empfindlich erweist, trat bisher nicht auf.

Damit ist jetzt die Basis für eine Prävalidierung im Sinne einer Anwendungsbeobachtung gegeben. Der Methodentransfer zu den beteiligten Gruppen erwies sich als unproblematisch. Sehr hilfreich ist, daß durch die entsprechende Entwicklung der Firma DPC Biermann eine standardisierte Kit-Version des Tests jetzt auch käuflich zur Verfügung steht, die die Prüfung und Eichung von vielen Einzelkomponenten überflüssig macht. Die hier vorgestellten ersten Versuche mit Parenteralia stimmen optimistisch. Es bleibt nun zu prüfen, ob auch mit natürlich auftretenden pyrogenen Verunreinigungen ähnlich günstige Ergebnisse erzielt werden, wie mit den experimentell mit Endotoxinen versetzten Materialien.

Das primäre Ziel dieser Arbeiten liegt sicherlich in der Ablösung des Kaninchentests, das nach der bisherigen Datenlage in greifbare Nähe gelangt. Der zwar nur auf historischen Daten basierende Vergleich der Potenz verschiedener Endotoxine im Kaninchen und im Blutmodell stützt diese Annahme.

Der hier erstmals vorgestellte Vergleich mit dem Limulus-Test ergibt wichtige Ergebnisse: Der LAL-Test ist, auch durch langjährige Weiterentwicklung, etwas sensibler auf Endotoxine als der Vollblut-Pyrogentest. Nachteilig ist jedoch die Tat-

sache, daß der LAL-Test die biologische Potenz von Endotoxinen im Mensch nicht widerspiegelt. In einem extremen Fall unterschied der LAL nicht zwischen zwei Endotoxinen, deren Potenz im Vollblut sich um den Faktor 10.000 unterschied. Da zudem das Problem der Beschränkung des LAL auf Gram-negative Pyrogene seit langem bekannt ist, scheint es sinnvoll, weitere Erkenntnisse auch im Hinblick auf bisherige Haupteinsatzgebiete des LAL-Tests zu sammeln.

Literatur

- Dabbah, R., Ferry, E. Jr., Gunther, D. A., Hahn, R., Mazur, P., Neely, M., Nicholas, P., Pierce, J. S., Slade, J., Watson, S., Weary, M. and Sanford, R. L. (1980). Pyrogenicity of E. coli 055:B5 endotoxin by the USP rabbit test—a HIMA collaborative study. *Journal of the Parenteral Drug Association* 34, 212-216.
- Dinarelli, C. A., O'Connor, J. V., LoPreste, G. and Swift, R. L. (1984). Human leukocytic pyrogen test for detection of pyrogenic material in growth hormone produced by recombinant *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 20, 323-329.
- Greisman, S. E. and Hornick, R. B. (1969). Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 1154-1158.
- Hansen, E. W. and Christensen, J. D. (1990). Comparison of cultured human mononuclear cells, *Limulus* amoebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. *J. Clin. Pharm. Ther.* 15, 425-433.
- Hartung, T. and Wendel, A. (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX* 12, 70-75.
- Hartung, T. and Wendel, A. (1996). Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Toxicol.* 9, 353-359.
- Keene, W. R., Silberman, H. R. and Landy, M. (1961). Observations on the pyrogenic response and its application to the bioassay of endotoxin. *Journal of Clinical Investigation* 40, 295-301.
- Pearson, C. F., III (1985). Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. In J. R. Robinson, (ed.), *Pyrogens* (3-272). New York and Basel: Marcel Dekker, Inc.
- Tsuji, K., Steindler, K. A. and Harrison, S. J. (1980). *Limulus* amoebocyte lysate assay for detection and quantification of endotoxin in a small-volume parenteral product. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 533-538.
- Weary, M. E., Donohue, G., Pearson, F. C., Story, K. (1980). Relative potencies of four endotoxin standards as measured by the *Limulus* amoebocyte lysate and USP rabbit pyrogen test. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 1148-1151.

Danksagung

Die Arbeit wurde gefördert durch die ZEBET, das BMBF und die Firma Roche-Boehringer. Wir danken Gregor Pinski und Katja Hartzsch für die exzellente technische Unterstützung

Korrespondenzadresse

Dr. Dr. Thomas Hartung
Universität Konstanz
Biochemische Pharmakologie
D-78457 Konstanz
Tel.: +49-7531-883619
Fax: +49-7531-884117
E-mail:
Thomas.Hartung@uni-konstanz.de



DER HUMANE PYROGEN TEST

PyroCheck mißt authentischer:

Zuverlässige Pyrogen-Detektion
im menschlichen Vollblut statt am Tier

PyroCheck mißt humaner:

Vermeidung von ca. 80.000 Tierversuchen
im Jahr allein in Deutschland

Pyrocheck mißt sicherer:

Erfassung Gram-negativer Endotoxine
und auch Gram-positiver Pyrogene

DPC
BIERMANN

Tel. 06032/994-00
Fax 06032/994-200
dpc_biermann@compuserve.com

