

Die Geschichte der Validierung des LAL-Tests

Manfred Liebsch

ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch), D-Berlin

Zusammenfassung

Unter den fiebererzeugenden Stoffen (Pyrogenen) haben die bakteriellen Endotoxine gram-negativer Bakterien die größte Bedeutung. Da Endotoxine als Verunreinigungen im Produktionsprozeß in pharmazeutische Produkte gelangen können, wird als Prüfung auf Reinheit seit etwa 50 Jahren der Test auf Pyrogene (Fiebertest) am Kaninchen weltweit gesetzlich verlangt. Der LAL-Test nutzt als in vitro Test eine Gerinnungsreaktion der Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*, die Zellen beim Kontakt mit bakteriellen Endotoxinen zeigen. Diese Reaktion ist der auch beim Menschen bei Belastung mit Endotoxinen auftretenden Blutgerinnung sehr ähnlich. Obwohl der LAL-Test Endotoxine Endotoxinen sehr viel empfindlicher nachweist als der Kaninchen-Test, hat der Test erst 25 Jahre nach seiner Entwicklung behördliche Akzeptanz als Ersatz des Kaninchen-Tests erreicht. Verzögert wurde die rasche Einführung des LAL-Tests, weil einige Stoffe die LAL-Reaktion stören können, und weil es fiebererzeugende Stoffe gibt, die keine Endotoxine sind. Der LAL-Test muß daher auch heute noch für jedes neue Produkt als Ersatzmethode für den Fiebertest am Kaninchen produktbezogen validiert werden, z.B. in Deutschland nach einer seit 1993 gültigen Richtlinie. Nach den Erfahrungen der letzten 10 Jahre kann der LAL-Test etwa 95% der Kaninchen Tests ersetzen, dabei wird das Risiko für den Verbraucher nicht erhöht.

Summary: History of the LAL-test: validation and regulatory acceptance

Bacterial endotoxins gram-negative bacteria are the most relevant substances inducing hyperthermia in humans (pyrogens). Since endotoxins may contaminate pharmaceutical preparations during production process, purity is assured by monitoring the increase in body temperature of rabbits exposed to such preparations. This bioassay can be replaced by the LAL-test in which the clotting reaction of blood cells of the horseshoe crab *limulus polyphemus* is measured after contact with bacterial endotoxins. Although this reaction is significantly more sensitive to endotoxins than hyperthermia in rabbits, the LAL-test had to undergo 25–30 years of validation to achieve regulatory acceptance. Although endotoxin induced blood clotting in *Limulus* is quite similar to the same reaction in humans, acceptance of the assay as an alternative to testing in rabbits was delayed, since chemicals present in pharmaceutical preparations may interfere with the LAL clotting reaction. In addition, fever can be induced also by substances other than endotoxins. Therefore it has to be proven for each new preparation that the LAL-test can replace the rabbit pyrogen test in a case by case validation according to guidelines, as e.g. the German guideline, which was released in 1993. During the past decade some laboratories of the pharmaceutical industry in Germany were able to, replace 95% of the rabbit pyrogen tests by the LAL-test without increasing the risk for humans.

Keywords: LAL-test, bacterial endotoxin, rabbit pyrogenicity test, validation, regulatory acceptance, product safety, alternatives to animal testing

1 Einleitung

Alle pharmazeutischen Substanzen, Zubereitungen und biologischen Produkte, die dem Menschen unter Umgehung des Verdauungstraktes verabreicht werden, d.h. parenteral durch Injektion oder Infusion (sog. Parenteralia), müssen auf Unbedenklichkeit hinsichtlich möglicher fiebererzeugender (sog. pygener) Ei-

genschaften geprüft werden. Das gilt auch für Medizinprodukte, die direkt oder indirekt mit dem Blut des Menschen in Kontakt kommen. Die behördlich geforderte Prüfung auf Pyrogene (d.h. auf fiebererzeugende Stoffe) erfolgt im Tierversuch am Kaninchen, und zwar durch die Bestimmung des Anstiegs der Körpertemperatur nach intravenöser Injektion der zu prüfenden Substanz. Die

Prüfung auf Pyrogene ist weltweit in Arzneibüchern beschrieben, z.B. für Deutschland im Deutschen Arzneibuch (DAB), für Europa in der EU Pharmakopöe und für die USA in der US Pharmakopöe. Dieser biologische Test wird sowohl im Rahmen der Zulassung eines neuen Arzneimittels, als auch später bei Chargenkontrollen des bereits zugelassenen Arzneimittels verlangt.

Durch eine spezifische Reaktion der Blutkörperchen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) können bakterielle Endotoxine, die die wichtigste Gruppe der Pyrogene bilden, im sogenannten Limulus Amöbozyten Lysat (LAL) Test sehr empfindlich und spezifisch nachgewiesen werden. Die Amöbozyten werden für diesen Test durch schonende, tierschutzgerechte Punktion aus Pfeilschwanzkreben gewonnen. Da die Endotoxine die gefährlichsten Pyrogene sind – und in vielen Parenteralia auch als einzige –, wurde der LAL-Test bereits kurz nach seiner Entwicklung vor ca. 25 Jahren als *in vitro* Methode zum Ersatz des Pyrogentests am Kaninchen vorgeschlagen. Seit dieser Zeit wurde der LAL-Test in vielen weltweit durchgeführten Studien optimiert, seine Brauchbarkeit und Relevanz für die Testung verschiedener Produkte geprüft und für eine ständig zunehmende Anzahl von Produkten behördlich akzeptiert.

Die Geschichte der Entwicklung des LAL-Test ist besonders interessant. Einerseits hat sie zum weitgehenden Ersatz eines Tierversuches in der sicherheitstoxikologischen Risikobewertung geführt, andererseits sind die dem Test zugrunde liegenden Mechanismen wissenschaftlich gut untersucht und wurden für relevant befunden. Sie ist weiterhin aus wissenschaftlichen Gründen beispielhaft, da der Pyrogenitätstest am Kaninchen nicht generell ersetzt werden konnte. Es muß auch heute noch für jedes neue Produkt durch den Hersteller belegt werden, daß der LAL-Test geeignet ist, den Test auf Pyrogene am Kaninchen vollständig zu ersetzen. Die Validierung erfolgt also produktbezogen. Auslösend für Entwicklung und Validierung des LAL-Tests waren ursprünglich nicht der tierschützerische Gründe, sondern die offenkundigen Grenzen des Tierversuches bei der Testung bestimmter Produkte. Die folgende Übersicht stützt sich zum Teil auf Gedanken, die Flint kürzlich in einer Übersicht dargestellt hat (1994).

2 Der Test auf Pyrogene am Kaninchen

Nach der Einführung der Injektionspritze vor etwa 150 Jahren finden sich in der Literatur erste Berichte über injektions-bedingtes Fieber, darunter auch Fieber nach Injektion von destilliertem Wasser (Billroth, 1865; Burdon-Sanderson, 1876). Später wurde nachgewiesen, daß die Pyrogenität nicht durch Hitzesterilisation der Injektionslösungen zu beseitigen war und somit keine direkte Folge der Kontamination mit lebenden Keimen darstellte. Als pyrogene Komponente wurde in Injektionslösungen eine „nicht-protein-artige“, hitzestabile Substanz beschrieben (Centanni, 1894), mit der in mehreren Studien zu Beginn dieses Jahrhunderts bei Kaninchen Fieber ausgelöst werden konnte. Die erste Beschreibung des Pyrogenitätstests am Kaninchen mit Injektion von inaktivierten, gram-negativen Bakterien erfolgte durch Hort & Penfold (1912). Der standardisierte Pyrogenitätstest am Kaninchen wurde aber erst Anfang der 40er Jahre in den USA durch Ringversuche validiert (z.B. McCloskey et al., 1943) und in die US Pharmakopöe (USP) aufgenommen. Zwischen den ersten Fiebertests am Kaninchen und der Aufnahme dieses Tests in behördliche Richtlinien lagen also etwa 30 Jahre.

Nach der im Europäischen Arzneibuch (EP) und im Deutschen Arzneibuch (DAB) identischen Vorschrift V.2.1.4 (DAB 10, 1991) werden im Pyrogenitätstest zunächst drei Kaninchen intravenös behandelt. Liegt der Anstieg der rektalen Körpertemperatur pro Kaninchen unter 0.4°C, ist die Charge unverdächtig, liegt er über 0.9°C, ist die Charge abzulehnen; liegt der Wert dazwischen, ist die Prüfung mit drei weiteren Kaninchen zu ergänzen. Die Hinzunahme von jeweils drei weiteren Tieren kann bis zu maximal 12 Tieren erfolgen. Liegt bei 12 Tieren die Summe der Körpertemperatur-Zunahmen über 6.6°C (= 0.55°C/Tier), ist die Charge endgültig abzulehnen. Die Kaninchen dürfen für eine er-

neute Prüfung bedingt wiederverwendet werden.

Ungeachtet der Fragen des Tiereschutzes (z.B. Fixierung der Kaninchen während des Versuches), zeigt diese Beschreibung, daß sich der Pyrogenitätstest je nach Ausgang der ersten Prüfungen zu einer zeitaufwendigen, kostenintensiven Prozedur entwickeln kann. Als problematisch hat sich aber die Tatsache erwiesen, daß bestimmte Stoffe im Pyrogenitätstest nicht prüfbar sind. Dies sind z.B. Substanzen, zu deren pharmakodynamischen Eigenschaften eine Senkung (z.B. Sedativa, Narkotika) oder Steigerung (z.B. Zytokine) der Körpertemperatur gehört, aber auch alle Moleküle, die allergische Reaktionen hervorrufen können, wie Antibiotika, Plasmaproteine und Antigene. Mit der Einführung der radioaktiven Arzneimittel (Radiopharmazeutika) um 1970 entwickelte sich rasch ein dringender Bedarf zum Ersatz des Kaninchentests. Radiopharmazeutika sind Arzneimittel oder Zubereitungen, die Radionuklide (radioaktive Elemente) enthalten und meistens zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden. Radionuklide haben oft kurze Halbwertszeiten, sie sind also kurzlebig und in der oben beschriebenen, zeitaufwendigen Prozedur am Kaninchen nicht testbar. Diese Unzulänglichkeit des Kaninchentests war die wesentliche Ursache für erste Validierungen des LAL-Tests, der zufällig zu diesem Zeitpunkt als standardisierter Test zum Nachweis bakterieller Endotoxine beschrieben wurde (Cooper et al., 1971).

3 Endotoxin

Als Endotoxin wird ein Gemisch aus der Wand gram-negativer Bakterien bezeichnet, das für die Fieberreaktion bei Infektionen mitverantwortlich ist. Diese Endotoxine bestehen überwiegend aus Lipopolysacchariden (LPS) sowie aus Proteinen und Spuren von weiteren Komponenten. Die LPS-Komponente des Endotoxins umfaßt eine große Zahl weiterer

Moleküle von unterschiedlicher Größe. Gelangt Endotoxin in das Blut des Menschen, so wird abhängig von der Menge ein klinisches Krankheitsbild hervorgerufen, das von einfacher Temperaturerhöhung bis hin zum dramatischen Endotoxinschock mit hohem Fieber und Gerinnung des Blutes mit Todesfolge (DIC = *disseminated intravascular coagulation*) reicht.

Durch Endotoxin aktiviert, setzen Makrophagen Botenstoffe frei, neben andern Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF). Während IL-1 Reaktionen verschiedener Organe hervorruft (u.a. Fieber durch den Hypothalamus), leitet TNF in den Endothelzellen der Gefäße den Prozeß der Blutgerinnung ein. Daneben kann Endotoxin über die Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII direkt die Blutgerinnung auslösen. Die zuletzt genannte, direkte Wirkung ähnelt in überraschender Weise dem Ablauf der Gerinnung des Blutes des Pfeilschwanzkrebses, der die Grundlage des LAL-Tests bildet (Flint, 1994).

4 Der LAL-Test auf bakterielle Endotoxine

Durch die Untersuchungen von Howell (1885) waren schon Ende des vorigen Jahrhunderts die Ähnlichkeiten zwischen der Gerinnung des Blutes beim Menschen und der Gerinnung der Hämolymphe („Blut“) beim Limulus nachgewiesen worden. Diese Untersuchungen wurden dann über 70 Jahre nicht weiter verfolgt, bis Bang (1956) eine bakterielle Infektion in einer Pfeilschwanzkrebs-Population beschrieb, die zur Gerinnung (= Koagulation) des Blutes der Pfeilschwanzkrebse führte. Untersuchungen der Ursachen für diese Reaktion brachten die Erkenntnis, daß die Koagulation des Limulus-Blutes eine Reaktion der Amöbozyten auf bakterielle Endotoxine darstellte (Levin und Bang, 1964). Nach gründlichen Untersuchungen dieses Phänomens wurde eine standardisierte Methode zum

Nachweis von Endotoxinen beschrieben (Levin & Bang, 1968), die auf dem Prinzip beruhte, daß ein Lysat (= gewaschene Zellen des Blutes) von Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses bei Kontakt mit Endotoxinen gerinnt und ein Gel bildet. Zu dieser ursprünglichen Testvariante, die auf einer qualitativen Endpunktbestimmung der Gelbildung nach 60 Minuten beruhte, wurden später noch sensitivere Methoden entwickelt.

Obwohl die an der Blutgerinnung beteiligten Mechanismen beim Menschen komplizierter sind als beim Pfeilschwanzkrebs, sind sie prinzipiell ähnlich (Reaktionskaskade mit Verstärkungsfunktion) und haben ähnliche funktionelle Komponenten. So müssen die Gerinnungsfaktoren C und D bei Limulus zum Auslösen der Kaskade ebenso aktiviert werden wie der Faktor XII bei der Blutgerinnung des Menschen. Die Blutgerinnung bei Limulus und beim Menschen kann mit den gleichen Enzym-inhibitoren gehemmt werden und synthetische Substrate zum Nachweis der Gerinnungsfaktoren des Menschen bilden ebenso Substrate für die Komponenten des Gerinnungssystems von Limulus (Flint, 1994).

Selbstverständlich gibt es auch Substanzen, die den LAL-Test stören. Nach Pericin (1986) sind die wichtigsten Stoffgruppen, die sich nicht im LAL-Test prüfen lassen, Antikoagulantien (EDTA, Citrat, Heparin, u.ä.), Enzym-Inhibitoren (SH Gruppen), einige Plasmaproteine (z.B. g-Globuline, Albumin und alle Gerinnungsfaktoren), Rauwolfia Alkaloide, und Zubereitungen, die einen Gehalt von mehr als 2% Ethanol aufweisen. Alle heute gültigen Richtlinien für die Validierung des LAL-Tests beinhalten daher eine Prüfung der möglichen Interferenzen des LAL Tests mit Bestandteilen des Prüfproduktes in Form einer gleichzeitigen Prüfung (sog. „spiken“) des Produktes mit Zugabe einer definierten Menge internen Endotoxin-Standards.

5 Grenzen beim Nachweis von Pyrogenen, die keine Endotoxine sind (sog. nicht-endotoxin Pyrogene), im LAL-Test

Der LAL-Test erfaßt Pyrogenität, die auf einer Kontamination mit Endotoxinen beruht, mit viel höherer Sensitivität als der Kaninchentest. Andersartige fiebelerzeugende Stoffe werden jedoch nicht erkannt. Zu diesen Stoffen zählen Alkaloide, Steroide, Redoxfarbstoffe, kolloide Metalle, Weichmacher, Antigen-Antikörperkomplexe und Botenstoffe, wie das Cytokin Interleukin-1 (selbst endogenes Pyrogen). Sofern solche Stoffe als geplante Bestandteile eines Produkts Pyrogenität erwarten lassen, sollten über einen Zeitraum beide Tests (Kaninchentest und LAL-Test) parallel durchgeführt werden. Besondere Vorsicht ist geboten, wenn nicht der Hauptwirkstoff, sondern produktionsbedingte Verunreinigungen Pyrogene enthalten, die keine Endotoxine sind (sog. nicht-endotoxin Pyrogene), wie z.B. Weichmacher. Die heute vorgeschriebene Sicherung der Qualität der Produktion nach den Richtlinien der „good manufacturing practice“ (GMP) schließt diese Fälle allerdings nahezu aus. So berichtet Müller-Calgan (1993), daß bei 29 000 Prüfungen in den Laboratorien der Firma Merck nur bei 2 Produkten mit je einer Rohstoffcharge Pyrogenität auftrat, die durch den Endotoxingehalt nicht erklärbar war.

Es ist dabei zu unterstreichen, daß Produkte, die nicht-endotoxin-Pyrogene enthalten, als unerwünschte Nebenwirkung beim Menschen zwar Fieber erzeugen könnten, nicht aber den gefürchteten Endotoxin Schock. Wie bereits dargestellt, wurde um die Jahrhundertwende das Endotoxin gramnegativer Bakterien als Auslöser von Fieber und sehr viel schwererer Symptome bis hin zum LPS-Schock entdeckt. Historisch gesehen diente der Pyrogentest am Kaninchen in erster Linie dem Schutz des Menschen vor endotoxin-kontaminierten Produkten und weniger vor anderen, möglicherweise Fieber erzeugenden Substanzen.

Der LAL-Test kann nach den vorangehenden Ausführungen sicher den Pyrogentest am Kaninchen nicht vollständig ersetzen. Umgekehrt ist der Pyrogentest am Kaninchen zum Nachweis bakterieller Endotoxine unempfindlicher als der LAL-Test. Nach Flint (1994) erfassen beide Tests jeweils ein Teilgeschehen des gefürchteten Endotoxin-Schocks. So ist die Blutgerinnung (DIC) nicht die einzige Reaktion auf Endotoxine, sie tritt jedoch bei jeder hohen Belastung mit Endotoxinen auf. Im LAL-Test wird diese spezifische Reaktion zum äußerst empfindlichen Nachweis von Endotoxinen verwendet, und zwar bis hinunter in den pg-Bereich, in dem Endotoxine für den Menschen noch völlig ungefährlich sind. Die im Kaninchentest erfaßte Fieberreaktion ist ebenso nur eine wichtige Reaktion auf Endotoxine, die bei jeder Belastung mit Endotoxinen auftritt. Betrachtet man also die Empfindlichkeit beider Tests, so wird deutlich, daß sich beide Tests in der Hinsicht gleichen, daß sie wesentliche Teilreaktionen (Fieber und Blutgerinnung) der komplexen Reaktion des Körpers auf Endotoxin erfassen.

6 Produktbezogene Validierung des LAL-Tests – Unterschiede zwischen den USA (FDA) und Europa (EP)

Gemäß den derzeit gültigen Richtlinien zur Validierung des LAL-Tests muß sichergestellt werden, daß sich der LAL-Test für die Testung eines Produktes eignet. Dies gilt für neuartige Produkte ebenso wie für die Umstellung der regelmäßigen Chargenkontrollen eines im Verkehr befindlichen Produktes vom Kaninchen Test auf den LAL-Test. Die Validierung ist also für jedes Produkt vom jeweiligen Hersteller einzeln durchzuführen und nicht in Ringversuchen wie in der Toxikologie. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß nach den bisherigen Erfahrungen mit Parenteralia Endotoxine grampositiver Bakterien und anderer Keime prak-

tisch nicht mehr vorkommen und daher kein Sicherheitsrisiko für den Menschen darstellen (Müller-Calgan, 1993). Somit ist der LAL-Test in der Lage, bei voller Wahrung der Prinzipien des maximalen Verbraucherschutzes den Test auf Pyrogenität schrittweise zu ersetzen.

Es gibt einen grundsätzlichen Unterschied bei der Validierung des LAL-Test zum Ersatz des Tests auf Pyrogenität am Kaninchen in den USA und in Deutschland. Nach der heute gültigen FDA Richtlinie (FDA, 1987) müssen für das zu prüfende Produkt folgende Nachweise experimentell geführt werden:

1. Es muß die Sensitivität des verwendeten LA-Lysates und der verwendeten Testvariante (Gelbildung, Turbidimetrie oder „Chormogen-Substrat-Methode“) durch mehrfache Testung einer Verdünnungsreihe eines Endotoxin Standards nachgewiesen werden.
 2. Es ist nachzuweisen, daß in dem Präparat keine *Störfaktoren* enthalten sind, die das Ergebnis des LAL-Tests positiv oder negativ verfälschen können. Dies geschieht durch gleichzeitige Testung des fertigen Produktes mit einer bekannten Menge an Endotoxin (engl. „spiken“).
- In Deutschland muß entsprechend der derzeit gültigen Richtlinie zur Validierung des LAL-Tests (Bundesanzeiger 2: 6.01.1993, Seite 67) zusätzlich zu diesen zwei Nachweisen experimentell nachgewiesen werden, daß
3. das Produkt keine nicht-endotoxin-Pyrogene enthält. Auch wenn die pharmakologisch-toxikologische Charakterisierung des Produktes solche Pyrogene nicht erwarten läßt, muß dieser Nachweis durch Paralleltestung im Kaninchen-Test und LAL-Test erbracht werden. Vorgeschrieben sind dabei drei verschiedene Produktionschargen, wenn aus der Entwicklung des Produktes keine Daten mit Paralleltestung vorliegen, oder an mindestens einer Produktionscharge, wenn schon während

der Produktentwicklung parallel getestet wurde.

4. Bei jeder wesentlichen Änderung des Herstellungsverfahrens muß die Validierung des LAL-Tests gemäß Punkt 1–3 nochmals erfolgen (sog. Revalidierung).

7 Behördliche Akzeptierung des LAL-Test

Ausland

In den USA begann das *Bureau of Biologics* der FDA erstmalig 1973 den Gebrauch des LAL-Tests zu regulieren (*Federal Register*, 1973) und propagierte den Test für die Anwendung bei Radiopharmazeutika im Jahr 1976. Zwar wurde der LAL-Test als Methode in die US Pharmacopöe (USP XX) bereits 1980 aufgenommen, aber erst 1987 wurde die endgültige Richtlinie der FDA für die Anwendung des LAL-Tests anstelle des Tests auf Pyrogenität veröffentlicht (FDA, 1987). Seit Veröffentlichung des 5. Nachtrages der USP XXII am 15.11.1991 ist die Zahl der Beschreibungen der Herstellung einzelner Arzneimittel in sog. „Monographien“ auf über 200 angestiegen, in denen der „BET“ (= Bacterial Endotoxin Test = LAL-Test) den Test auf Pyrogene am Kaninchen ersetzt hat.

Deutschland

Seit Erscheinen des DAB 9, 2. Nachtrag im Jahre 1991, darf jeder Hersteller gemäß der allgemeinen Monographie „Parenteralia“ den LAL-Test anstelle der Prüfung auf Pyrogene am Kaninchen anwenden „...wenn dies in einer Monographie des Arzneibuches vorgeschrieben oder von der zuständigen Behörde zugelassen ist“. In Fällen der Neuzulassung oder Nachzulassung war dies unproblematisch, da die zuständige Behörden BGA und PEI (Paul Ehrlich Institut) mit der Beurteilung von Zulassungsunterlagen nach dem neuesten Stand wissenschaftlicher Erkenntnis gemäß §2 AMG vertraut waren. Für Hersteller, die jedoch die regelmäßigen geforderten Qualitätskontrollen eines

zugelassenen, bereits im Verkehr befindlichen Produktes vom Kaninchentest auf den LAL-Test umstellen wollten, waren die Überwachungsbehörden der Länder zwar zuständig, aber mit der Beurteilung derartiger Unterlagen nicht vertraut. Im DAB 10 wurde daher Anfang 1992 der Terminus „zuständige Behörde“ durch „zuständige Bundesoberbehörde“ ausgetauscht, d.h. seit dieser Zeit werden die im Zuge von Änderungsanzeigen eingereichten Unterlagen der Hersteller im BGA und seit dem 1.7.1994 im Nachfolgeinstitut BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte), sowie im PEI im Rahmen der Amtshilfe beurteilt. Es soll in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben, daß diese Tätigkeit trotz der Änderung im DAB 10 nicht ganz unproblematisch ist, da die oberen Bundesbehörden formaljuristisch nicht zuständig sind für die Zulassung von Testverfahren, sondern für die Zulassung von Produkten.

Die Änderung des DAB war für viele Hersteller von Parenteralia noch nicht befriedigend, da gleichzeitig in Deutschland noch keine offizielle Richtlinie veröffentlicht vorlag, in der der Umfang und die Art der Untersuchungen für die Validierung des LAL-Tests als Ersatz zum Pyrogentest am Kaninchen genau definiert war. Basierend auf der im Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie erarbeiteten Richtlinie zur Validierung des LAL-Tests (Kiltz-Schwalm et al., 1991) veröffentlichten daher die beiden zuständigen Bundesoberbehörden BGA und PEI (Bundesanzeiger 2: 6.01.1993, Seite 67) eine „Bekanntmachung zur Möglichkeit des Ersatzes der Prüfung auf Pyrogene durch die Prüfung auf Bakterien Endotoxine nach DAB 10 (Parenteralia; Prüfung auf Reinheit)“. Aus dieser Richtlinie kann seitdem jeder Hersteller entnehmen, wie er den LAL-Test für sein Produkt validieren kann.

Bei der abschließenden Wertung ist festzuhalten, daß zwar das DAB die Umstellung vom Test auf Pyro-

gene auf den LAL Test nicht zwingend verlangt, daß aber das Tierchutzgesetz immer dann die Anwendung einer versuchstierfreien Methode zwingend vorschreibt, wenn mit ihr das gleiche Ziel erreicht werden kann. Bei sorgfältiger, produktbezogener Validierung trifft das für den Ersatz des Pyrogentest am Kaninchen durch den LAL-Test in den meisten Fällen zu.

Literatur

- Bang, F. B. (1956). A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 98, 325–351.
- Billroth, T. (1865). Beobachtungs-Studien über Wundfieber und accidentelle Wunderkrankungen. *Archiv für klinische Chirurgie* 6, 372–495.
- Burdon-Sanderson, J. (1876). On the process of fever. *Practitioner* 16, 257–280, 337–358, 417–431.
- Centani, E. (1984). Über Infektions-Fieber. *Chem. Zentralblatt* 6, 597–604.
- Cooper, J. F., Levin, J. and Wagner, H. W. (1971). Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 78, 138–148.
- Deutsches Arzneibuch, 10. Ausgabe (1991). V.2.1.4 Prüfung auf Pyrogene. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag. Frankfurt/Eschborn: Govi-Verlag GmbH
- Federal Register Notice, *Limulus Amebocyte Lysate (Additional Standards)* (38 FR 180), September 18, 1973. Washington: National Archives of the U.S..
- Flint, O. (1994). A timetable for replacing, reducing and refining animal use with the help of in vitro tests: the *Limulus amebocyte lysate test (LAL)* as an example. In: Ch. A. Reinhardt (Hrsg.), *Alternatives to Animal Testing. New Ways in the Sciences, Trends and Progress.* (27–43). Weinheim: Verlag Chemie (VCH).
- Food and Drug Administration (1987). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, „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.*“
- Hort, E. and Penfold, W. J. (1912). The reaction of salvarsan fever to other forms of injection fever. *Proceedings of the Royal Society of Medicine (Pt III. Pathology)* 5, 131–139.
- Howell, W. H. (1885). Observation upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria sp.* *Johns Hopkins University Circ.* 5, 45.
- Kiltz-Schwalm, R., Müller-Calgan, H. und Rosenberg, U. (1992). Richtlinie (RL) des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie (BPI): Validierung des LAL-Testverfahrens im Rahmen der Zulassung und Nachzulassung für Parenteralia. *Pharm. Ind.* 10, 832.
- Levin, J. and Bang, F. B. (1964). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 115, 265–274.
- Levin, J. und Bang, F. B. (1968). Clottable protein in *Limulus*: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 19, 186–197.
- McCloskey, W. T., Price, C. W., Van Winkle, W., Welch, H. und Calver, H. O. (1943). Results of first USP collaborative study of pyrogens. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific edition)* 22, 69–73.
- Müller-Calgan, H. (1993). LAL-Test: Bestandsaufnahme und Ausblick (Möglichkeiten und Grenzen) beim Ersatz des Kaninchen-Pyrogentests. In H. Schöffl, H. Spielmann, F.-P. Gruber, B. Koidl, Ch. A. Reinhardt (Hrsg.): *Alternativen zu Tierversuchen in Ausbildung, Qualitätskontrolle und Herz-Kreislauf-Forschung.* pp. 183–197. Wien, New York: Springer-Verlag.
- Pericin, C. (1985). Der *Limulustest*: Ein in-vitro-Pyrogennachweis. *Alternativen zu Tierexperimenten* 2, 21–34.

Kontaktadresse

Manfred Liebsch
ZEBET, Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz (BgVV)
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin