



# Erfahrungen mit dem LAL-Test aus der Sicht eines Filterherstellers

Ursula Brendel-Thimmel

Seitz-Filter-Werke GmbH und Co., D-Bad Kreuznach

## Zusammenfassung

In dem Artikel wird der Einsatz des LAL-Tests zur Bestimmung des Endotoxingehaltes von Filtermaterialien sowie zur Bestimmung der Endotoxinabtrennung mit Hilfe positiv geladener Tiefenfilter beschrieben. Während für diese Bestimmungen ausschließlich der Gel- oder Röhrchentest eingesetzt wird, werden im zweiten Teil des Artikels verschiedene LAL-Testmethoden diskutiert.

*Summary: Experiences with the LAL-test from the viewpoint of a filter manufacturer.*

*This paper focuses on the application of the LAL-test for the determination of the endotoxin content of filter materials as well as for the determination of the endotoxin retention by positively charged depth filters. Whereas the gel clot test is exclusively used for these determinations, in the second part of the paper different LAL-test methods are discussed.*

**Keywords:** LAL-test, filter materials, endotoxin content, endotoxin retention, positively charged depth filters, LAL-test methods

## 1 Der LAL-Test zur Bestimmung des Endotoxingehaltes von Filtermaterialien

Bei der Herstellung von Tiefenfiltern, Membranfiltern und Filterkerzen, die zur Filtration von Parenteralia und anderen Pharmaka eingesetzt werden, ist die Prüfung auf Endotoxine zur Freigabe der Filter unerlässlich. Im Gegensatz zu den pharmazeutischen Produkten selbst ist jedoch die Prüfung von Filtermaterialien auf Endotoxine in den Arzneibüchern nicht festgelegt. Mehr noch, es gibt keinerlei gesetzliche Vorgaben über das Wie und die Grenzwerte einer solchen Prüfung.

Im Sinne der Prüfung auf Endotoxine sind Filterschichten (Tiefenfilter bestehend z.B. aus Kieselgur, natürlicher und modifizierter Cellulose und Harzen) als das schwierigste Produkt anzusehen. Es wurde daher, in enger Kooperation mit den Filteranwendern, folgende Testmethode entwickelt:

Zwei Prüflinge Ø 6 cm werden übereinander in ein endotoxinfreies Filtergerät eingelegt und 15 min. bei 121° C autoklaviert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Endotoxine eluiert, indem eine Eiweißlösung filtriert wird. Gemäß der Verwendung von Filterschichten erfolgt

die Elution nicht wie bei *Medical Devices* durch Schütteln in einer bestimmten Lösung, sondern durch Filtration. Dabei ist die extrahierende Wirkung der Eiweißlösung, die deutlich höher ist als die von Elektrolytlösungen oder Wasser, von entscheidender Bedeutung. Dazu ist Voraussetzung, daß die Eiweißlösung unverdünnt im Geltest bei der gewünschten Empfindlichkeit von ca. 0,06 EU/ml prüfbar ist, d.h. keine hemmende oder fördernde Wirkung zeigt. Den Endotoxingehalt der Filterschichten erhält man durch Prü-

fung der Eiweißlösung vor und nach der Filtration im LAL-Geltest. Wichtig bei der Angabe von Zahlenwerten ist das Verhältnis Elutionsmittel zu Filterfläche bzw. Filtermasse. So bedeutet in den Beispielen der Tabelle 1 ein Endotoxingehalt von < 0,06 EU/ml im Filtrat einen Wert von < 600 EU pro m<sup>2</sup> Filterfläche oder < 0,4 EU/g Filterschicht.

Der LAL-Test wird als Geltest im Röhrchen durchgeführt. Bedingt durch die Komplexität des Testsystems kann der Nachweis auch mit kinetischen Tests nicht empfindlicher gestaltet werden.

Tabelle 1: Endotoxingehalt von SEITZ-Filter-schichten

Typ	Charge	Endotoxingehalt (EU/ml)
SEITZ-SUPRA® EK 1 P	4903	< 0,06
	4881	< 0,06
SEITZ-SUPRA® 80 P	4811	< 0,06
	4738	< 0,06
SEITZ-EKS® P	4859	< 0,06
	4823	< 0,06
SEITZ-KS® 50 P	4739	< 0,06
	4490	< 0,12
SEITZ-BIO® 10	3979	< 0,06
	3791	< 0,06
SEITZ-BIO® 20	3852	< 0,06
	3991	< 0,06
SEITZ-BIO® 30	3853	< 0,06
	3678	< 0,06
SEITZ-BIO® 40	3961	< 0,06

Bei der Typenreihe SEITZ-BIO handelt es sich um kieselgurfreie Tiefenfilter

## 2 Der LAL-Test zur Bestimmung der Endotoxinabtrennung mit positiv geladenen Tiefenfiltern

Dazu werden fünf Lösungen mit einem Endotoxin aus *E. coli* 055:B5 hergestellt, wobei die Konzentration der Lösungen 1–5 um je 1 Dezimale ansteigt.

Diese Lösungen werden über die zu prüfende Schicht filtriert und in getrennten Kolben gesammelt. Sodann wird jeweils der Endotoxingehalt von Unfiltrat und Filtrat im LAL-Geltest bestimmt. Als Kennzahlen werden die Endotoxinreduktion oder Endotoxinretention berechnet:

$$\text{Endotoxinreduktion} = \log_{10} \frac{\text{Endotoxingehalt Unfiltrat EU/ml}}{\text{Endotoxingehalt Filtrat EU/ml}}$$

$$\text{Endotoxinretention} = \sum_{\text{Fraktion 1}}^{\text{Fraktion 5}} \left( \frac{\text{EU/ml im Unfiltrat} - \text{EU/ml im Filtrat}}{\text{effektive Filterfläche (cm}^2\text{)}} \right) \times \text{Filtratvolumen ml}$$

Das Ergebnis einer solchen Untersuchung ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Bei steigendem Endotoxingehalt im Unfiltrat erhält man bis zu einer Konzentration von 60 000 EU/ml endotoxinfreie Filtrate. In diesem Beispiel ist dann die Filterschicht gesättigt und es kommt zu Passagen. Bis zu diesem Sättigungspunkt können  $3,2 \times 10^5$  EU/cm<sup>2</sup> adsorbiert werden.

Da es sich um eine adsorptive Abtrennung handelt, ist die Endotoxinretention positiv geladener Filter von einer ganzen Reihe von Faktoren abhängig, wobei die chemisch-phy-

sikalischen Eigenschaften der filtrierten Lösungen die wichtigste Rolle spielen. Reinstwasser und Zuckerlösungen lassen sich problemlos entpyrogenisieren. Sobald jedoch Ionen in einer bestimmten Konzentration oder gar geladene Eiweißmoleküle vorliegen, werden die adsorptiv wirkenden Zentren des Filters verlegt und die Endotoxine nicht mehr effektiv zurückgehalten (s. Abb.).

## 3 Verschiedene LAL-Testmethoden

In Ergänzung zu den üblicherweise im Röhren- oder Geltest durchge-

führten Untersuchungen wurden verschiedene LAL-Testmethoden erprobt. Prinzipiell stehen zur Verfügung:

1. Geltest
2. Kinetische Tests
  - a) mit chromogenem Substrat
  - b) turbidimetrisch
3. Endpunktmethode
  - a) mit chromogenem Substrat
  - b) turbidimetrisch

Hat man beim Geltest noch in der Hauptsache das Reagenz (Testkit) auszuwählen, so kommen bei den automatisierten kinetischen Tests die Auswahl des Gerätes (Titerplatten-

reader, Trübungsmeßgerät) und der Software als wesentliche Punkte hinzu.

Aus der Vielfalt von Systemen standen für die Versuche zur Verfügung:

1. Kinetischer Test mit chromogenem Substrat, KQCL-Testkit im
  - a) KQCL-Gerät, Fa. Serva
  - b) Thermomax, Fa. Molecular Devices
2. Kinetisch-turbidimetrischer Test
  - a) LAL 5000, Pyrotell T, Fa. Pyroquant
  - b) Thermomax, Fa. Molecular Devices mit Reagenz der Fa. Serva

Im folgenden werden drei Punkte, die sich bei den Untersuchungen als interessant erwiesen, diskutiert:

### 3.1 Nachweisgrenze und notwendige Verdünnungen in verschiedenen LAL-Tests am Beispiel dreier Lösungen

Als ein wichtiges Entscheidungskriterium für automatisierte kinetische Tests wird immer wieder die höhere Empfindlichkeit im Vergleich zum Röhrentest ins Feld geführt. Dazu wurden in einer Versuchsreihe physiologische Kochsalzlösung, 5%iges Humanalbumin und eine Oxypolygelatine-Lösung im Geltest, kinetisch-chromogenen und kinetisch-turbidimetrischen Test untersucht (s. Tabelle 3). Die unproblematisch zu prüfende physiologische Kochsalzlösung konnte bei allen drei Testmethoden unverdünnt eingesetzt werden, so daß in den kinetischen Tests tatsächlich um 1 Dezimale niedrigere Endotoxinwerte noch bestimmt werden können. Für Humanalbumin als anerkannt schwierige Lösung im LAL-Test hingegen waren unterschiedlich hohe Verdünnungen nötig, so daß die Spanne zwischen Geltest und kinetischen Tests hier deutlich geringer ist (0,6 EU/ml zu 0,1 EU/ml). Die dritte Lösung ließ sich im Geltest mit Pyrogent Reagenz und im kinetisch-chromogenen Test unverdünnt prüfen, jedoch ließ sie sich im kinetisch-turbidimetrischen trotz starker Verdünnung (1 : 100) nicht testen. Die Oxypolygelati-

Tabelle 2: Endotoxinretention eines positiv geladenen Tiefenfilters (SEITZ-SUPRA® EK 1 P) in reinem Wasser

Endotoxingehalt Unfiltrat EU/ml	Endotoxingehalt Filtrat EU/ml	log <sub>10</sub> Endotoxinreduktion	Endotoxinretention EU/cm <sup>2</sup>
60	< 0,06	> 3	285
600	< 0,06	> 4	3142
6000	< 0,06	> 5	$3,2 \times 10^4$
60000	< 0,06	> 6	$3,2 \times 10^5$
600000	600	4	$3,2 \times 10^6$

ne-Lösung ist damit ein typisches Beispiel für hochmolekulare Substanzen, die den kinetisch-turbidimetrischen Test stark beeinträchtigen.

Folgerung aus diesen Untersuchungen ist, daß je nach zu prüfendem Produkt und notwendiger Nachweisgrenze die LAL-Testmethode sorgfältig ausgewählt werden muß und man sich nicht von den maximal möglichen Empfindlichkeiten einzelner Testsysteme oder gar der auf dem Etikett des Reagenzes aufgedruckten Empfindlichkeit leiten lassen sollte.

### 3.2 Hohe Störanfälligkeit kinetischer Tests bei im Vergleich zum Geltest erhöhten Empfindlichkeiten

Wenn hier von im Vergleich zum Geltest erhöhten Empfindlichkeiten gesprochen wird, so ist der Bereich zwischen 0,01 und 0,001 EU/ml gemeint. Daß genau in diesem Bereich auch Störeinflüsse am größten sind, soll folgendes Fallbeispiel zeigen (s. Tabelle 4):

Über einen großen Zeitraum wurde zur Rekonstitution des Reagenzes für den Geltest ein bestimmtes Wasser verwendet. Die erste Charge eines KQCL-Testkits für den kinetisch-chromogenen Test wurde ebenfalls damit validiert. Bei der Eingangvalidierung eines neuen KQCL-Testkits wurde plötzlich nur noch eine Empfindlichkeit von 0,05 EU/ml statt 0,005 EU/ml erreicht, da die

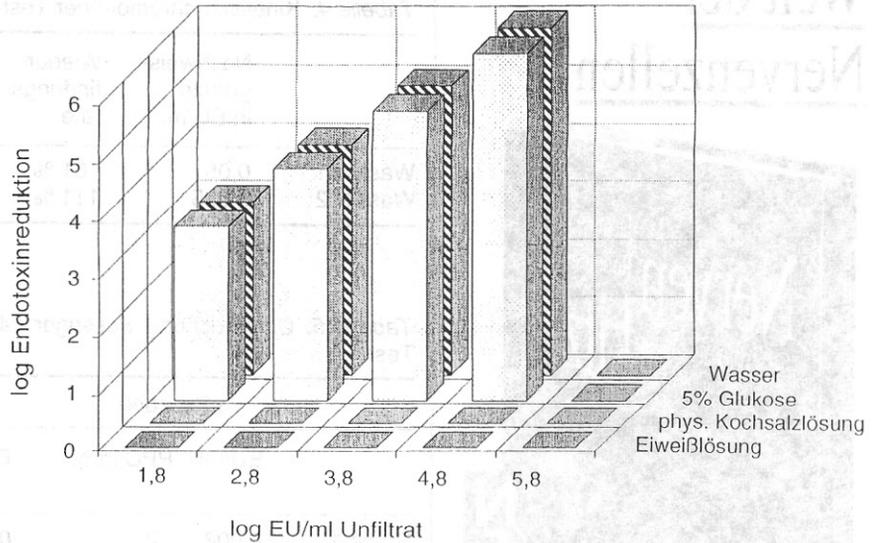


Abbildung: Endotoxinabtrennung mit SEITZ SUPRA® EK 1 P

onset times > 5400 s lagen. Versuche mit einem zweiten Wasser zeigten, daß hier die gewünschte Empfindlichkeit mit dem gleichen Reagenz zu erreichen war. Das Spiken der beiden Wässer zeigte dann deutlich, daß im Bereich < 0,05 EU/ml eine Hemmung des Tests durch Wasser 1 vorlag.

#### Fazit

Im Bereich < 0,05 EU/ml sind kinetische Tests sensibler gegen Störfaktoren. Nur durch Validierung jeder neuen Charge Materials, sei dies nun das Testkit, Pipettenspitzen oder Ti-

terplatten, sind hohe Empfindlichkeiten reproduzierbar.

### 3.4 Sind Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Methoden und Geräten ermittelt wurden, vergleichbar?

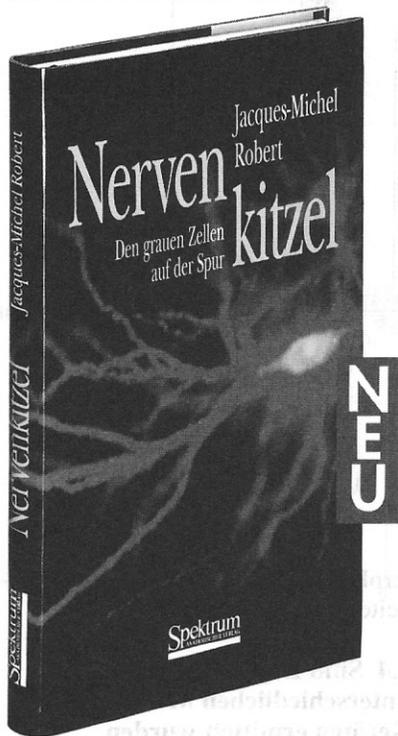
Zwei wässrige Filterschichteneluate wurden mit verschiedenen LAL-Testmethoden untersucht (s. Tabelle 5). Für Probe 1 ergaben sich im kinetisch-turbidimetrischen, kinetisch-chromogenen Test und im Geltest mit zwei verschiedenen Reagenzien Endotoxinwerte zwischen 0,01 und 0,03 EU/ml.

Tabelle 3: Nachweisgrenzen und Verdünnungen zum Test

Lösung LAL-Test	0,9 %ige Kochsalzlösung		5 %iges Humanalbumin		Oxypolygelatine	
	Verdünnung zum Test	Nachweis- grenze EU/ml	Verdünnung zum Test	Nachweis- grenze EU/ml	Verdünnung zum Test	Nachweis- grenze EU/ml
Geltest mit Pyrogent 0,06 EU/ml	unverdünnt	0,06	1 : 10	0,6	unverdünnt	0,06
Kinetisch-chromogen mit KQCL-Testkit und Thermomax 0,005 EU/ml	unverdünnt (0,05)	0,005	1 : 20	0,1	unverdünnt	0,005
Kinetisch-turbidimetrisch im LAL 5000 0,001 EU/ml	unverdünnt	0,001	1 . 100	0,1	> 1 : 100	nicht prüfbar PPC* 99 %

\* PPC = Positive Product Control

# Die elektrisierende Welt der Nervenzellen



Jacques-Michel Robert

## Nervenkitzel

Neuronen sind einzigartig. Keine andere Zelle ist ähnlich spezialisiert und kommunikativ. Wie sind diese Grundbausteine des Gehirns aufgebaut. Was macht sie so anpassungsfähig und flexibel? Autor Robert versteht es meisterhaft, den Leser mit großer Sachkenntnis, Humor und einer sehr bildhaften Sprache in seinen Bann zu ziehen. ca. 336 S., 75 Abb., geb. DM 49,80/öS 389,-/sFr 48,- ISBN 3-86025-345-X

### Gelesen und empfohlen

„Ich habe das Buch mit großem Vergnügen gelesen. Es ist eine wirklich spritzige und umfassende...Behandlung des neuronalen Umfeldes...ein Sachbuch für einen breiten Leserkreis.“

Wolf Singer, Direktor des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung, Frankfurt

# Spektrum

AKADEMISCHER VERLAG

Vangerowstr. 20 · D-69115 Heidelberg

BRENDEL-THIMMEL



Tabelle 4: Kinetisch-chromogener Test mit 2 verschiedenen Wässern

	Nachweisgrenze in EU/ml	Wiederfindungsrate	Regressionsgeradenbeschreibung Korr. Koeff.	y-Achse	Steigung
Wasser 1	0,05	61 %	-0,998	3,27	-0,196
Wasser 2	0,005	111 %	-0,998	3,21	-0,207

Tabelle 5: Untersuchung wässriger Filterschichteneluate in verschiedenen LAL-Tests

	LAL 5000		KQCL		Geltest	
	EU/ml	PPC in %	EU/ml	PPC in %	Pyroquant EU/ml	Pyrogent EU/ml
Probe 1	0,008	2	0,022	-11	0,03	< 0,06
Probe 2	0,016	99	2,294	52		0,3
	0,052	73			1,5	0,3

PPC = Positive Product Control  $\pm$  50 %

Bei Probe 2, die eine den Test fördernde Wirkung zeigt, divergieren hingegen die Ergebnisse zwischen 0,016 und 2,294. Dies heißt, daß beim Nachweis von Endotoxinen in geringster Konzentration exakte Zahlenwerte zwar nicht miteinander verglichen werden können, Tendenzen jedoch gut zu erkennen sind. Sind jedoch Störfaktoren vorhanden, ist selbst dies nicht mehr möglich.

### Anmerkung:

SEITZ-SUPRA, SEITZ-EKS, SEITZ-KS, SEITZ-BIO sind eingetragene Warenzeichen der SEITZ-FILTER-WERKE, GmbH und Co.

### Korrespondenzadresse

Ursula Brendel-Thimmel  
Seitz-Filter-Werke GmbH und Co.  
Planiger Str. 137  
D-55543 Bad Kreuznach