

Pyrogenbestimmung: Ein Vergleich verschiedener Methoden

Jutta Meisel

Hoechst AG, D-Frankfurt am Main

Zusammenfassung

Bei Pyrogenen handelt es sich um eine Gruppe chemisch sehr verschiedener Substanzen, die bei parenteraler Applikation Fieber und in schweren Fällen sogar Schock auslösen können. Die wichtigsten Pyrogene in der pharmazeutischen Industrie sind Bakterien-Endotoxine, bei denen es sich um Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien handelt. Es gibt zwei Nachweismethoden: Der Pyrogentest beruht auf der Messung der Körpertemperatur von Kaninchen vor und nach Injektion der Probe, der LAL-Test basiert auf der Reaktion eines Enzymkomplexes aus Zellen des Pfeilschwanzkrebses in Gegenwart von Endotoxinen (in vitro Test). Vor- und Nachteile beider Tests werden nachfolgend verglichen. Obwohl der LAL-Test mittlerweile im großen Maße eingesetzt wird, ist ein vollständiger Ersatz des Pyrogentests bis heute noch nicht möglich. Der Grund liegt insbesondere darin, daß einerseits mit dem LAL-Test lediglich Endotoxine nachgewiesen werden können und andererseits einige Substanzen im LAL-Test nicht gemessen werden können, da sie den Test stören. Ein Beispiel wird mit dem Vergleich der Ergebnisse aus der Prüfung dreier verwandter Cephalosporine mit dem Pyrogentest und verschiedenen Methoden des LAL-Tests (Geltest, kinetisch-turbidimetrische und kinetisch-chromogene Methode) gegeben.

Summary: Determination of Pyrogens: Comparison of Different Methods.

Pyrogens are a group of chemically diverse substances that cause fever and shock in severe cases. The most important pyrogenic substances in pharmaceutical industry are bacterial endotoxins. Bacterial endotoxins are part of the cell wall of gram negative bacteria. There are two methods of detection: the Pyrogen test is based upon the measurement of body temperature of rabbits before and after injection of the specimen, the LAL-test is based upon the clotting reaction of an enzyme complex of cells of the horseshoe crab together with bacterial endotoxins (in vitro test). Advantages and disadvantages of the two tests have been compared. Although the LAL-test is widely used a total replacement of the Pyrogen test is still not possible since on the one hand the LAL-test will only detect bacterial endotoxins and on the other hand not all specimen can be tested with the LAL-test because of interference with the test. An example has been given by comparing the test results of three related cephalosporins in the Pyrogen test and different methods of the LAL-test (gel clot, turbidimetric kinetic, chromogenic kinetic).

Keywords: pyrogen determination, LAL-tests, gel clot LAL, turbidimetric LAL, chromogenic kinetic LAL, bacterial endotoxins, cephalosporin

1 Einleitung

Als Pyrogene werden alle Stoffe bezeichnet, die, einmal in der Blutbahn, Reaktionen beim Menschen auslösen, die vom einfachen Fieber mit Schüttelfrost bis hin zu tödlichem Kreislaufversagen reichen. Zu diesen Stoffen gehören die Bakterien-Endotoxine als wirksamste aller Pyrogene, bei denen es sich um Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien handelt. Sie machen den Großteil der Pyrogene aus, die in Arzneimitteln gefunden werden. Als seltenere und weniger wirksame Pyrogene sind neben etlichen Viren einige wenige synthetische Substanzen und Schwermetalle (z.B. Organozinnverbindungen) zu nennen. Bei

der Verabreichung größerer Mengen von Pyrogenen können schwerwiegende Zwischenfälle auftreten. Aus diesem Grund wird in allen Pharmakopöen die Prüfung auf Pyrogene bzw. Endotoxine gefordert.

2 Vergleich der unterschiedlichen Nachweismethoden

In den für uns relevanten Pharmakopöen (DAB, EUAB, USP) sind die Prüfung auf Pyrogene und die Prüfung auf Endotoxine aufgeführt, wobei die ältere Monographie der Pyrogentest ist. Dieser wird am Kaninchen durchgeführt und bietet einige Schwierigkeiten, da die Tiere auf jegliche Störung zunächst einmal mit

Temperaturerhöhung reagieren. Deshalb wird erst nach einer Anlaufphase, in der die Tiere sich beruhigen sollen, das Produkt gespritzt und die Körpertemperatur jedes Tieres dann über mehrere Stunden überprüft. Die Grenzwerte für Temperaturerhöhungen, die auftreten dürfen bzw. eine Wiederholung erlauben, fallen im Vergleich der Pharmakopöen sehr unterschiedlich aus, so daß bei internationalem Verkauf die strengsten Anforderungen zu ermitteln sind. Das ist sicherlich auch ein Grund für die fehlende Standardisierbarkeit des Pyrogentestes.

Die Prüfung auf Bakterien-Endotoxine wird mit Hilfe des LAL-Testes durchgeführt, bei dem ein Extrakt aus Blutzellen des Pfeil-

schwanzkrebse *Limulus polyphemus* in Gegenwart von Endotoxin mit Trübung oder Gelbildung reagiert. Aus dieser Reaktion sind die unterschiedlichsten Methoden des LAL-Tests entwickelt worden. Die einfachste ist sicher der Geltest, bei dem die Mischung aus Prüflösung und LAL nach Inkubation auf Gelbildung hin untersucht wird. Dabei ergibt sich eine ja/nein-Aussage, die Rückschlüsse darüber zuläßt, ob die Prüflösung einen Endotoxingehalt oberhalb der Empfindlichkeit des Lysates aufweist oder nicht. In jüngerer Zeit wurden neben der halbquantitativen des Geltests auch quantitative Methoden entwickelt. Dazu gehören einerseits die Methoden der Endpunktbestimmung, bei denen die Trübung oder Farbentwicklung einer Probe gemeinsam mit einer Standardreihe zu einem festen Zeitpunkt nach Inkubation gemessen werden. Andererseits gibt es kinetische Methoden, bei denen die Entwicklung der Trübung bzw. einer Färbung einer Probe zusammen mit einer Standardreihe in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt wird. Die Zeit, die eine Prüflösung benötigt, um eine bestimmte Extinktion zu erreichen, ist ein Maß für deren Endotoxingehalt.

Jede Methode – Pyrogentest und LAL-Test – hat Vor- und Nachteile, die nachfolgend noch einmal aufgeführt werden sollen. Besonders hervorzuheben ist beim Pyrogentest der Vorteil, daß alle Pyrogene, also auch Nicht-Endotoxin-Pyrogene erfaßt werden. Um eine Kontamination des Produktes mit den zuletzt genannten Stoffen auszuschließen, sollte deshalb neben dem LAL-Test an einigen Chargen auch der Pyrogentest angewendet werden. Dieses Vorgehen erweist sich heute insbesondere bei der Neuentwicklung eines Produktes als wertvoll, da hierdurch mögliche Kontaminationen rechtzeitig erkannt werden, und der Prozeß gegebenenfalls umgestellt werden kann. Als besonders gravierender Nachteil des Pyrogentests ist dagegen die Tatsache zu nennen, daß es sich dabei um einen Tierversuch handelt, der auf-

grund der Komplexität des Organismus Tier im allgemeinen schwer zu standardisieren ist. Daraus ergibt sich die Verpflichtung zu überprüfen, ob mit einer Ersatzmethode gleiche Ergebnisse erzielt werden können. Da der LAL-Test zwar die wichtigsten Pyrogene, also die Endotoxine erkennt, nicht aber die wesentlich weniger häufig vorkommenden restlichen Pyrogene, kann auf den Pyrogentest als Mittel zur Validierung der Pyrogenfreiheit eines Produktes bis heute noch nicht verzichtet werden. Dem trägt die Verlautbarung des BGA bzw. BMA Rechnung, in der die parallele Prüfung von drei Chargen eines Produktes im Pyrogentest und LAL-Test gefordert wird. Wurde dabei die Abwesenheit von Nicht-Endotoxin-Pyrogenen gezeigt, ist es dann im Sinne des Tierschutzgesetzes als durchaus sinnvoll anzusehen, den Pyrogentest für ein Produkt durch den *in vitro* LAL-Test zu ersetzen. Zusätzlich ist dann die Validierung jedes Produktes im LAL-Test unbedingte Voraussetzung, weil – wie nachher noch erläutert wird –, nicht alle Produkte für die Prüfung im LAL-Test geeignet sind.

Nach Überwindung all dieser Anfangsschwierigkeiten bietet der LAL-Test eine ganze Reihe unschätzbbarer Vorteile. Insbesondere ist zu erwähnen, dass sich mit dem LAL-Test ein wesentlich weiteres Probenspektrum, also z.B. auch viele Inprozeß-Kontrollen, die nicht am Tier testbar sind, mit zugleich höherer Empfindlichkeit prüfen läßt, was eine Prozeßvalidierung in bezug auf Endotoxinabreicherung oder eine Fehlersuche in nicht zu unterschätzendem Maße erst erleichtert.

Zunächst einmal ist grundsätzlich davon auszugehen, daß jedes zu prüfende Produkt den LAL-Test stört. Eine der einfachsten Methoden, die Störung in den Griff zu bekommen, ist die Verdünnung. 99 % unserer Produkte lassen sich auf diese Weise ohne Probleme validieren und danach prüfen. Die Übereinstimmung der Ergebnisse des LAL-Tests mit denen des Pyrogentests ist ebenfalls

gegeben. Wie unterschiedlich aber selbst eng verwandte Stoffe im LAL-Test reagieren können, soll nachfolgend anhand von drei verschiedenen Cephalosporinen dargestellt werden.

3 Drei verschiedene Cephalosporine im Vergleich

Antibiotika sind eine Substanzklasse, die auch im Kaninchentest nicht ganz einfach zu prüfen sind, da insbesondere bei mehrfacher Prüfung am gleichen Tier Nebeneffekte durch die Störung der Darmflora auftreten können. Das ist auch bei den Cephalosporinen nicht anders, so daß hier der Umstieg auf den LAL-Test besonders wünschenswert erscheint. Wir haben versucht, unsere drei verschiedenen Cephalosporine zunächst wie alle unsere Endprodukte mit Hilfe des Geltests zu validieren (Tab. 1). Das klappte auch ohne Probleme bei zwei Proben, wobei Cephalosporin 1 bereits bei einer Verdünnung, die weit unter der MVD liegt, geprüft werden kann, Cephalosporin 2 dagegen an der MVD geprüft werden muß (MVD ist die höchste Verdünnung, auf die ein Produkt eingestellt werden darf, um noch eine Endotoxinkonzentration in der Ausgangslösung erkennen zu können, die dem Limit entspricht). Auch Cephalosporin 3 ließ sich an der MVD noch validieren, jedoch nur unter solch großen Schwierigkeiten, daß uns die Prüfung im Geltest als nicht haltbar erschien. Tab. 2a zeigt auch schon die Tendenz der Reaktion des Geltests auf unser Produkt: Es geht hier eindeutig um eine Verstärkung des Tests. So reichen geringste Mengen endogenes Endotoxin aus, um in der Validierung Gelbildung außerhalb der 2λ -Grenze zu erhalten. Wir haben es hier also mit dem seltenen Fall eines „*Enhancements*“ zu tun.

Um die Prüfung von Cephalosporin 3 trotzdem vom Pyrogentest auf den LAL-Test umzustellen, wurden quantitative Tests zur Prüfung angewendet, da diese im allgemeinen durch eine höhere Empfindlichkeit

des Lysates gekennzeichnet sind (Tab. 2a). Dafür untersuchten wir das Produkt zunächst mit dem kinetisch-turbidimetrischen Test des LAL-5000. Das Ergebnis wies sich durch stark schwankende Wiederfindungsraten des Endotoxins in der Positivkontrolle auch noch bei höheren Verdünnungen als der MVD (1:59) aus, die zu einem großen Teil außerhalb des erlaubten Bereiches von früher $\pm 25\%$ bzw. heute $\pm 50\%$ lagen (Tab. 3).

Die hier anhand von zwei Chargen exemplarisch dargestellten Ergebnisse konnten mit einer ganzen Reihe weiterer Chargen bestätigt werden. Das *Enhancement* durch Cephalosporin 3, das bereits im Geltest beobachtet wurde, bestätigt sich also auch im kinetisch-turbidimetrischen Test. Interessanterweise bleibt diese Reaktion auch bei größten Verdünnungen bestehen. Daneben ist die Wirkung des Produktes auf die Wiederfindungsrate nicht konstant, d.h. daß das *Enhancement* einer Verdünnungsstufe bei der nächsthöheren aufgehoben ist, bei weiteren Verdünnungsstufen jedoch wieder auftritt.

Eine weitere Möglichkeit, das Problem in den Griff zu bekommen, wäre sicher der Einsatz einer Produkt-Standardkurve gewesen. Wir haben diesen Ansatz nicht ausgeführt, da bei diesen stark schwankenden Wiederfindungsraten nicht zu erwarten war, daß die vorgeschriebenen Parameter für interne Standardkurven gehalten worden wären.

Der Versuch, mittels Ultrafiltration das Problem zu lösen, scheiterte entweder an der Beschaffenheit der Filter, die Glucose abgaben und damit den Test störten, oder an zweifelhaften Abtrennleistungen derselben.

Zur Zeit wird bei uns das Cephalosporin 3 aus diesen Gründen weiterhin im Kaninchen getestet. Daneben untersuchen wir die Validierbarkeit des Produktes im kinetisch-chromogenen Test. Wie in der folgenden Tabelle 4 zu sehen, scheinen diese Versuche auch erfolgreich zu sein.

Aus diesem Vortest kann der Schluß gezogen werden, daß ab einer Verdünnung von 1:20 bei einer

Tabelle 1: Prüfbarkeit der drei Cephalosporine im Geltest

Cephalosporin	validierbare Verdünnung	MVD
1	1 : 50	1 : 333
2	1 : 16	1 : 16
3	1 : 16	1 : 16

Tabelle 2a: Validierung des Cephalosporin 3 im Geltest (deklarierte Empfindlichkeit: 0,03 EE/ml)

Charge	Verdünnung	0,0625 EE/ml	0,0313 EE/ml	0,0156 EE/ml	0,0078 EE/ml	Negativ-Kontrollen
1	1 : 16	+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
2	1 : 16	+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
3	1 : 16	+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—
		+	+	+	—	—

Tabelle 2b: Lysat-Validierung:

0,0625 EE/ml	0,0313 EE/ml	0,0156 EE/ml	0,0078 EE/ml	Negativ-Kontrollen
++++	++++	—	—	—

Tabelle 3: Verhalten von Cephalosporin 3 im kinetisch-turbidimetrischen Test

Charge	Verdünnung	Spike (theoret.: 0,0312 EU/ml)	Wiederfindung (EU/ml)	Wiederfindungsrate (%)
1	1 : 10	0,0267	0,0519	166
	1 : 20	0,0267	0,0397	127
	1 : 40	0,0267	0,0422	135
	1 : 80	0,0267	0,033	105
	1 : 160	0,0296	0,0318	101
	1 : 320	0,0296	0,0576	184
	1 : 640	0,0296	0,0398	127
	1 : 1280	0,0296	0,0354	113
2	1 : 160	0,0372	0,0912	292
	1 : 320	0,0372	0,0767	245
	1 : 640	0,0372	0,096	307
	1 : 1280	0,0372	0,0899	288

Tabelle 4: Verhalten von Cephalosporin 3 im kinetisch-chromogenen Test

Verdünnung	Spike (theoret.)	Spike (gefunden)	Wiederfindungsrate (%)
1 : 10	0,02	0,019	95,6
1 : 20	0,02	0,021	102,6
1 : 40	0,02	0,020	99,8
1 : 80	0,02	0,020	98,4

Tabelle 5: Vor- und Nachteile von Pyrogen- und LAL-Test

Pyrogentest	LAL-Test
Vorteile	Vorteile
1 Jahrzehntelang weltweit erprobtes und anerkanntes Verfahren	1 <i>In vitro</i> Test
2 Die Empfindlichkeit und Reaktion des Kaninchens gegen Pyrogene ähnelt der des Menschen	2 Geringer Aufwand an Laborausstattung und Personal
3 Erfassung aller Pyrogene – nicht nur der Endotoxine	3 Schnelles Vorliegen der Ergebnisse
	4 Höhere Empfindlichkeit als der Pyrogentest
	5 Prüfung eines weiteren Produktspektrums als beim Pyrogentest möglich (IPC, THS, Filter, Wirk- und Hilfsstoffe, medizinische Geräte, Radiopharmaka, Überwachung von Prozeßwasser)
	6 Standardisierbarkeit
Nachteile	Nachteile
1 Hoher Aufwand für Tierhaltung, Meßstation und Labor	1 Nachweis lediglich von Bakterien-Endotoxinen, nicht von allen Pyrogenen
2 Zeitaufwendig	2 Kann nicht bei allen Arzneimitteln angewendet werden
3 Tierversuche	
4 Nicht standardisierbar	

MVD von 1:46 der Test validierbar ist. Desgleichen entsprachen auch die bis jetzt durchgeführten Validierungsläufe den gültigen Richtlinien. Sollte diese Methode von den Behörden für die Endproduktprüfung zugelassen werden, sehen wir gute Chancen, den Test für dieses Produkt auf LAL umzustellen.

An diesem Beispiel wird deutlich, daß manche Produkte nur unter Schwierigkeiten auf den LAL-Test zu bringen sind. Bekannt ist schon seit geraumer Zeit, daß stark proteinhaltige Produkte bis heute Schwierigkeiten im LAL-Test machen. Auch für unsere öligen Produkte war die Umstellung bis heute noch nicht möglich. Die Nichtanwendbarkeit des LAL-Tests für eine ganze Reihe von Produkten verhindert also bis

heute den Verzicht auf den Pyrogentest. Außerdem halten wir den vollständigen Ersatz des Pyrogentests durch den LAL-Test ohne gegenseitigen Abgleich für unmöglich, da wie oben bereits ausgeführt, der Pyrogentest zwar unempfindlicher gegen Endotoxine reagiert, dafür aber alle pyrogenen Substanzen entdeckt. Damit ist eine Überprüfung einiger Chargen eines Produktes im Pyrogentest auf alle Fälle anzuraten, ehe auf den LAL-Test umgestellt wird.

Korrespondenzadresse

Jutta Meisel
Hoechst AG, Pharma
Qualitätskontrolle
QBV, H 785
D-65926 Frankfurt am Main

Vorschau auf ALTEX 3/95 (erscheint August/September):

T. Rieg und C.-M. Löblein
(Fortsetzung): Schranken der
Lehrfreiheit, Fazit und Ausblick

G. Folkers: Modellierung von
Protein-Ligand Komplexen als
Basis einer rationalen
Arzneistoffentwicklung

D. Keller: Pharmakokinetik-
Simulationen im Unterricht

C. Strübing et al.: Etablierung
eines *in vitro* Modellsystems zur
Differenzierung synaptisch ver-
knüpfter Nervenzellen aus pluripo-
tenten embryonalen Stammzellen
der Maus

M. Schulz et al.: Fischzelllinien in
der toxikologischen Bewertung von
Abwasserproben

A. Vedani, SIAT-Newsletter 6:
Pseudo- und Toxorezeptoren in der
3R-Forschung

D. Schimmel und D. van Truong:
Pasteurellen in bebrütetem Hühner-
ei II