

Literatur

Europäisches Arzneibuch (1998), dritte Ausgabe 1997, Deutsche amtliche Ausgabe, S. II, 1. Stuttgart: Dtsch. Apotheker Verlag.
Europäisches Arzneibuch (1998), dritte Ausgabe 1997, Deutsche amtliche Ausgabe, S. II, 2. Stuttgart: Dtsch. Apotheker Verlag.
Gupta, R. K. (1996). Is the test for abnormal toxicity, general safety or innocuity necessary for vaccines. *Vaccines Vol 14*: 1718.

Krämer, B., Nagel, M., Duchow, K. und Schwanig, M. (1996). Ist die tierexperimentelle Prüfung auf anomale Toxizität für Impfstoffe, Sera und Immunglobuline noch zeitgemäß? *ALTEX 13*, 1: 7-16.

Schwanig, M., Nagel, M., Duchow, K. und Krämer, B. Elimination of abnormal toxicity test for sera and vaccines in the European Pharmacopoeia. *Vaccine, Vol 15, No. 10*, 1047-1048.

Korrespondenzadresse

Dr. Michael Schwanig
Paul Ehrlich Institut
Bakteriologie
Fachgebiet Impfstoffe I
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D- 63225 Langen
Fax: +49-6103-77-1234
E-mail: schwanig@em.uni-frankfurt.de



Entwicklung und Evaluierung eines Pyrogentests mit menschlichem Blut

Thomas Hartung, Stefan Fennrich, Matthias Fischer*, Thomas Montag-Lessing* und Albrecht Wendel
Universität Konstanz, Biochemische Pharmakologie, D-Konstanz, *Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

Zusammenfassung

Zellen des Immunsystems, insbesondere Blutmonozyten und Makrophagen, schütten bei Kontakt mit pyrogenen (fiebererzeugenden) Verunreinigungen Botenstoffe aus, die im Organismus die Fieberreaktion vermitteln. Der bekannteste Vertreter dieser endogenen Pyrogene ist das Interleukin-1 (IL-1). Ein neuer Pyrogentest macht sich genau diese Reaktion als Detektionssystem zu nutze: Die zu prüfenden Substanzen werden mit einer kleinen Blutmenge von einem gesunden Spender zusammen inkubiert. Anwesende Pyrogene machen sich dabei durch die Bildung von IL-1 bemerkbar, das im ELISA bestimmt werden kann.

Dieser neue Test ist im Vergleich zum bekannten Kaninchen-Pyrogentest sensibler, ökonomischer und mißt gleichzeitig die Reaktion der relevanten Spezies. Im Gegensatz zur gebräuchlichen 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. So konnten bereits mehr als 50 Nicht-Endotoxin-Pyrogene mit dem Test nachgewiesen werden. Selbst für den reinen Endotoxin-Nachweis zeigt sich der Bluttest dem LAL überlegen: Im Vergleich von knapp 60 Endotoxinen korrelierte die Potenz der einzelnen Endotoxine zwischen Bluttest und Kaninchen-Pyrogentest, aber keiner dieser Tests mit dem LAL. Im Einzelfall unterschieden sich Endotoxine im humanen Modell in ihrer Potenz um den Faktor 10.000 bei gleicher Wirkung im LAL.

Es wurde eine Methode entwickelt, um kryokonserviertes Blut für den Test nutzen zu können; damit können gegebenenfalls Blutspenden eines Spenders vorgetestet werden, um danach einheitliches Prüfmaterial einsetzen zu können.

Der Test eröffnet völlig neue Perspektiven der Pyrogentestung bei Gram-positiven oder Pilz-Pyrogenen sowie bei Medizinprodukten. Darüber hinaus könnte er eine gefährliche Sicherheitslücke schließen, die möglicherweise durch die beschränkte Prüfung von Medikamenten und Blutprodukten allein im LAL entsteht.

Dieses Projekt wurde gefördert durch ZEBET, D-Berlin, BMBF, D-Bonn und set, D-Mainz.

Summary: Development and evaluation of a pyrogen test based on human whole blood

When cells of the immune system, especially blood monocytes and macrophages, come into contact with pyrogenic (fever-inducing) contaminations, they secrete messenger molecules which initiate an hyperthermic reaction in the organism. Of this group of endogenous pyrogens, most is known about interleukin-1 (IL-1). A new pyrogen test makes use of this reaction as a system for detection: The substances which are to be screened are incubated with a small volume of blood from a healthy donor. Any pyrogens present induce the production of IL-1 which can be detected by ELISA.

This test has a higher sensitivity and is more economical than the conventional pyrogen test in rabbits and furthermore reflects the reaction of the relevant species. In contrast to the customary alternative method, the Limulus amoebocyte lysate test (LAL), this test is not restricted to endotoxins from Gram-negative bacteria and is also not hindered by substances which bind endotoxins, such as blood proteins, to the same extent. Consequently, more than 50 non-endotoxin pyrogens have already been traced by this test. The whole blood test is even superior to the LAL in regard to the detection of endotoxins: in a comparison of about 60 endotoxins, there was a correlation of the potency of the individual endotoxins between the whole blood test and the pyrogen test in rabbits, but neither test correlated with the LAL test. In some cases, endotoxins with equal effects in the LAL test differed in potency in the human blood model by a factor of 10 000.

Es wurde eine Methode entwickelt, um kryokonserviertes Blut für den Test nutzen zu können; damit können gegebenenfalls Blutspenden eines Spenders vorgetestet werden, um danach einheitliches Prüfmaterial einsetzen zu können.



A method has been developed by which cryopreserved blood can be put to use in the test. In this way, blood donations from a donor can be pre-tested so that uniform material may be employed in the test.

This test opens up entirely new perspectives on pyrogen testing for Gram-positive or fungal pyrogens as well as in medicinal products. In addition, it could fill the dangerous security gap which might result from the limitations of testing medications and blood products with LAL only.

The project was supported by ZEBET, D-Berlin, BMBF, D-Bonn, and set, D-Mainz.

Keywords: endotoxins, Gram-positive pyrogens, fungal pyrogens, human whole blood, interleukin-1

Korrespondenzadresse

Dr. Dr. Thomas Hartung
Universität Konstanz
Biochemische Pharmakologie
Postfach 5560
D-78434 Konstanz



Erste Erfahrungen bei der Prävalidierung des Vollblutpyrogentests für biologische Arzneimittel

Matthias Fischer¹, Katja Hartzsch¹, Thomas Hartung² und Thomas Montag-Lessing¹

¹Paul-Ehrlich-Institut; D-Langen, ²Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz, D-Konstanz

Zusammenfassung

Bei der Etablierung des alternativen Pyrogentestes für biologische Arzneimittel richteten sich erste Untersuchungen auf den Einsatz und die Behandlung des Standardpyrogens. Da es sich beim standardmäßig als Pyrogen eingesetzten LPS (Lipopolysaccharid) um eine stark hydrophobe Substanz handelt, spielt die Lösungsvermittlung eine besondere Rolle. Im Gegensatz zum LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test) konnte aber für den Vollblutpyrogentest eine eher verminderte Reaktivität bei zunehmend homogener Verteilung gezeigt werden.

Für eine Reihe biologischer Arzneimittel konnten erste Erfahrungen beim Test auf Pyrogene im humanen Vollblutasay gesammelt werden. Dazu gehören Albumin, Immunglobuline, Impfstoffe, Blutgerinnungsfaktoren und virusinaktiviertes Plasma. Mit Ausnahme der Impfstoffe und Albumine sind diese Arzneimittel z.Z. nur im Kaninchenpyrogentest testbar.

Für Albumin konnte gezeigt werden, daß durch das Arzneimittel eine leichte Verstärkung der Pyrogenität des Standard-LPS auftritt. Mit den Albuminen konnten sonst sicher reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Die Nachweisgrenze lag deutlich unter 50 pg/ml LPS.

Die Immunglobulinpräparate zeigen einen ähnlichen Verstärkungseffekt wie Albumine.

Mit Standardpyrogen dotierte Proben konnten sicher als pyrogen erkannt werden.

Die getesteten Impfstoffe zeigten leichte Pyrogenität, die aber erst bei Verdünnung der Impfstoffe sichtbar wurde. Unverdünnt eingesetzt maskierten die Impfstoffe auch Standardpyrogendotierungen.

Summary: First Results in the prevaluation of the human whole blood assay for pyrogens in biological pharmaceuticals. When establishing the whole blood assay for pyrogens in our laboratory we did several investigations on the standard pyrogen to be used. Because of the hydrophobicity of the lipopolysaccharid (LPS) it is difficult to get a homogeneous solution. Therefore we used ultrasonic and biphenyl hydroxyl amine chloride for a better dispergation.

Surprisingly the reactivity of the LPS in the whole blood assay for pyrogens dropped the more the LPS was dispergated. That's right inverse to the situation in the LAL.

There are first experiences in the whole blood assay for pyrogens with biological pharmaceuticals. This includes immunoglobulins, vaccines and coagulation factors.

Except of the vaccines and albumin the rabbit assay is the only way to test these pharmaceuticals for pyrogens.

The albumins show a little amplification of the reactivity of LPS in the whole blood assay for pyrogens. The testing of albumin in the whole blood assay for pyrogens showed highly reproducible results and a detection limit under 50 pg/ml LPS.

The immunoglobulins show an amplifying effect as well.

Immunoglobulins spiked with LPS were detected as pyrogenic in all cases.

Some vaccines show a slight pyrogenity in the whole blood assay which gets visible when diluting the sample. Undiluted vaccines may cover a LPS contamination in the whole blood assay for pyrogens.

Keywords: pyrogen testing, whole blood model, endotoxin, interleukin, contamination of biological products