

<i>Limulus</i> -Amöbocyten-Lysat	
<b>PYROCHROME®</b>	
Hersteller::	ASOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
	124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536
PN000856-de rev4	Okt. 2019

## PYROCHROME®

### zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (Lipopolysacchariden)

Der *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-(LAL-)Test kann bei Verwendung nach den Richtlinien der U.S. Food and Drug Administration (FDA) (1) zur (1) Endpunktprüfung von „injizierbaren Humanarzneimitteln (einschließlich biologischer Produkte), injizierbaren Tierarzneimitteln und Medizinprodukten“ eingesetzt werden. Der LAL-Test wird empfohlen zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen in Ausgangsstoffen für die Produktion, einschließlich Wasser, und zur Prozessüberwachung des Endotoxinspiegels. Der USP Bacterial Endotoxins Test (2) ist der amtliche LAL-Test, auf den einzelne USP-Monographien Bezug nehmen, und ist mit den entsprechenden Kapiteln der Europäischen Pharmakopöe (EP) (3) und der Japanischen Pharmakopöe (JP) (4) harmonisiert.

#### Zusammenfassung des Tests

Bei*m Limulus*-Amöbocyten-Lysat handelt es sich um einen wässrigen Auszug der Blutzellen (Amöbocyten) des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. Bei Vorhandensein von Endotoxinen werden Faktoren im LAL aktiviert, und zwar in einer proteolytischen Kaskade, die zur Spaltung eines Substrats aus farblosem, künstlichem Peptid führt, welches im Pyrochrome®-LAL vorliegt. Die proteolytische Spaltung des Substrats setzt Parantiroanilin (pNA) frei, das gelblich ist und Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Zur Durchführung des Tests wird einem Volumenteil Probe ein Volumenteil Pyrochrome® zugesetzt und die Reaktionsmischung bei 37 °C inkubiert. Je höher die Endotoxinkonzentration in der Probe ist, umso schneller wird pNA produziert. Pyrochrome® kann auf zwei verschiedene Weisen zur quantitativen Endotoxinbestimmung verwendet werden (5). Bei der kinetischen Methode wird die Zeit bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion bei 405 nm bestimmt (die Anlaufzeit). Eine höhere Endotoxinkonzentration entspricht einer kürzeren Anlaufzeit. Für den Assay sind Spezialinstrumente notwendig, die mehrere Proben bei einer kontrollierten Temperatur (üblicherweise 37 °C) inkubieren und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte messen können. Durch Auftragen der logarithmischen Anlaufzeit gegen die logarithmische Konzentration eines Standard-Endotoxins lassen sich Standardkurven erstellen, die zur Berechnung der Endotoxinkonzentration in den Proben dienen. Alternativ dazu kann die Menge an freigesetztem pNA nach einer festen Inkubationszeit gemessen werden. Dies ist die chromogene Endpunktmethode. Zur Bestimmung der Konzentration in den Proben wird eine Standardkurve verwendet, die durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte über der bekannten Standard-Endotoxin-Konzentration erstellt wird.

Die Pyrochrome®-Testmethoden sind schnell, spezifisch, einfach durchzuführen und hochsensitiv. Die Nachweisgrenze hängt von der verwendeten Methode und den eingesetzten Instrumenten ab und kann bis zu 0,001 Endotoxineinheiten (EU, Endotoxin Units) pro mL reichen. Wenn die Standardkurve der linearen Regression alle Akzeptanzkriterien erfüllt, können Standardkurven auch mittels polynomialer Regression erstellt werden.

#### Geschichte und biologisches Prinzip

Howell hat die Gerinnung von *Limulus*-Blut 1885 beschrieben (6). In den 1950er Jahren entdeckte Bang am Marine Biological Laboratory in Woods Hole, Massachusetts (USA), dass gramnegative Bakterien die Gerinnung von *Limulus*-Blut auslösen (7). Levin und Bang stellten nachfolgend fest, dass es sich dabei um eine enzymatische Reaktion handelt und dass die Enzyme sich in Körnchen in den Amöbocyten befinden (8, 9). Sie konnten nachweisen, dass die Gerinnung durch eine charakteristische Struktur der Zellwand des Bakteriums ausgelöst wird, das Endotoxin bzw. Lipopolysaccharid (10). Man geht heute davon aus, dass die Reaktion aus einer Kaskade von Enzymaktivierungsschritten besteht, die in der Spaltung des Proteins Koagulogen enden. Das unlösliche Spaltprodukt von Koagulogen (das Koagulin) verfestigt sich durch Ioneninteraktion. Bildet sich genügend Koagulin, führt dies zur Trübung und anschließend zur Bildung eines Gel-Clot. Dieses Wechselwirkung ist die Grundlage für einen Assay auf Endotoxine, der als *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL) bezeichnet wird. Im Jahre 1977 entdeckten japanische Forscher, dass endotoxin-aktiviertes LAL auch kleine chromogene Peptide spalten kann, die eine Aminosäure-Spaltstelle ähnlich dem Koagulogen

und dem Chromophor Parantiroanilid enthalten (11). Die Spaltung setzt pNA frei, das gelblich ist und Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Bei dieser chromogenen Adaption des LAL-Assays wird die Koagulogen-konzentration durch Verdünnung herabgesetzt, um die Interferenz bei der Zugabe des chromogenen Substrats zum LAL zu minimieren. Daher führt die Zugabe von Endotoxinen zu chromogenem LAL-Reagens vorzugsweise zur Farbbildung und nicht zur Trübung oder Bildung eines Gel-Clots. Für alle Versionen des LAL-Assays (Gel-Clot, turbidimetrisch und chromogen) gilt, dass der Endpunkt (Gel-Clot, Trübung oder Färbung) umso schneller erreicht wird, je mehr Endotoxine vorhanden sind. Näheres zu den LAL-Assaytypen, der Reaktion und den Anwendungen findet sich in der Literatur (12, 13, 14).

#### Reagens

Pyrochrome® ist als Lyophilisat in Packungen zu 3,2 mL/Fläschchen erhältlich. Es enthält einen wässrigen Auszug von *Limulus*-polyphemus-Amöbocyten, Stabilisator, Salze, Puffer und ein chromogenes Substrat.

Pyrochrome® ist nicht mit einer bestimmten Empfindlichkeit ausgezeichnet. Die Empfindlichkeit im Test (mit λ bezeichnet) ist jeweils die niedrigste Endotoxinkon-zentration, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet wurde. Die höchste Empfindlichkeit (λ) von Pyrochrome® beträgt 0,001 EU/mL in einem kinetischen Assay und 0,005 EU/mL in einem Endpunktassay. Pyrochrome® dient nur zur In-vitro-Diagnostik. Es ist nicht zur Diagnose einer Endotoxämie beim Menschen bestimmt. Die Toxizität von Pyrochrome® ist nicht bestimmt worden. Jedoch hat der langdauernde oder wiederholte Hautkontakt mit LAL bei manchen Personen zu einer allergischen Reaktion vom Typ I geführt (15). Beim Umgang mit Pyrochrome® ist daher Vorsicht geboten.

##### Vorgehen zur Rekonstitution:

1. Pyrochrome®-Fläschchen leicht antippen, damit sich loses Material auf dem Boden des Fläschchens absetzt. Durch Anheben des grauen Stopfens das Vakuum aufheben. Dabei die Mündung des Fläschchens nicht kontaminieren. Den Stopfen abnehmen und entsorgen. Nicht durch den Stopfen injizieren oder diesen wieder verwenden. Eine kleine, am Stopfen verbleibende Menge LAL-Pulver beeinträchtigt den Test nicht.

2. Pyrochrome® mit 3,2 mL Pyrochrome®-Puffer bzw. Glucashield®-Puffer (einzeln erhältlich von Associates of Cape Cod, Inc.) rekonstituieren. Zur Erzielung einer Empfindlichkeit von 0,001 EU/mL mit einem Plattenfotometer muss Pyrochrome® mit Glucashield® rekonstituiert werden. Wenn ein Röhrchen-Lesegerät verwendet wird, ist diese Empfindlichkeit sowohl mit Pyrochrome®-Rekonstitutionspuffer als auch mit Glucashield®-Puffer zu erzielen. Es dauert einige Minuten, bis sich die Tablette aufgelöst hat. Deswegen mindestens 5 Minuten vor der Anwendung rehydrieren. Das Fläschchen zur Homogenisierung schwenken, jedoch heftiges Schütteln vermeiden, das übermäßige Schaumbildung und Empfindlichkeitsverlust verursachen kann. Das Fläschchen mit Parafilm M® abdecken und bei Nichtgebrauch kalt (bei 2 °C bis 8 °C) lagern. Pyrochrome® muss innerhalb von 8 Stunden nach der Rekonstitution verwendet werden.

#### Lagerbedingungen

Gefriergetrocknetes Pyrochrome® ist relativ stabil und behält bei sachgemäßer Lagerung seine volle Aktivität bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verwendbarkeitsdatum. Produkt bei 2 °C bis 8 °C lagern. Temperaturen über 37 °C können die rasche Zersetzung von gefriergetrocknetem Pyrochrome® verursachen, was sich als Empfindlichkeitsverlust und deutliche Gelbfärbung des Produktes äußert. Pyrochrome® wird zum Schutz vor hohen Temperaturen in Isolierbehältern versandt. Pyrochrome® ist vor der Rekonstitution lichtempfindlich und muss dunkel gelagert werden.

Nach Rekonstitution liegt Pyrochrome® normalerweise in einer klaren und leicht opaleszierenden Lösung vor. Einzelne Chargen weisen gelegentlich eine leichte, uniforme Trübung auf. Das Vorliegen kleiner Fasern oder Stränge ist kein Hinweis auf Kontamination oder eine Beeinträchtigung der Aktivität; Ausflockung oder eine deutliche Gelbfärbung weist allerdings auf eine Zersetzung des Reagens hin und das Reagens darf in diesem Fall nicht verwendet werden. Rekonstituiertes Pyrochrome® ist weniger stabil als das gefriergetrocknete Produkt. Die Fläschchen dürfen bis zu 8 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Zu beachten ist, dass die maximale Empfindlichkeit gegebenenfalls nur mit frisch rekonstituiertem Reagens erreicht wird. Rekonstituiertes Pyrochrome® darf nicht eingefroren werden.

#### Probennahme und -vorbereitung

Proben sind aseptisch in Behälter zu nehmen, die keine nachweisbaren Endotoxine enthalten. Zur Minimierung der Adsorption von Endotoxinen an die Behälteroberfläche werden wieder verwendete, entpyrogenisierte Glasbehälter oder sterile Einweg-Kunststoffbehälter aus Polystyrol oder Polyethylenterephthalat (PET) empfohlen.Kunststoffbehälter sind nicht grundsätzlich frei von nachweisbaren Endotoxinen. Außerdem können lösliche Substanzen aus manchen Kunststoffen den Test stören. Das Laborgeschirr muss auf seine Eignung getestet werden. Dazu Behälter zufällig aus einer Charge auswählen, mit einem kleinen Volumen LAL-Reagenswasser (LRW) eine Stunde lang bei Raumtemperatur ausspülen und das Spülwasser wie eine Probe testen. Die Endotoxinkonzentration im Spülwasser muss erheblich unter der Konzentration des niedrigsten verwendeten Standards liegen. Auch darf das Spül-wasser den Test weder hemmen noch fördern, was durch die Wiederfindung einer bekannten Dotierung mit Endotoxinen bestimmt wird. Der pH-Wert des Reaktions-gemisches (ein Volumenteil Probe

bzw. verdünnte Probe gemischt mit dem gleichen Volumen Pyrochrome®) muss bei 6 bis 8 liegen. Den pH-Wert der Probe mit HCl, NaOH oder Puffer (keine nachweisbaren Endotoxine enthaltend) einstellen. Konzentrierte HCl oder NaOH mit LRW auf eine entsprechende Konzentration verdünnen und ein Volumen anwenden, das nicht zu einer signifikanten Verdünnung der Testprobe führt. Falls sich bei der pH-Einstellung in der Probe ein Niederschlag bildet, die Probe vor der pH-Einstellung verdünnen (dabei die hgV nicht überschreiten – siehe „Grenzen des Verfahrens“). Den pH-Wert von ungepufferter Kochsalzlösung bzw. Wasser nicht einstellen. Die Verdünnung selbst kann eventuell Probleme mit dem pH-Wert lösen.

Substanzen, die Proteine denaturieren, Chelatkomplexe mit Ionen bilden, Endotoxine binden oder den hydrophoben Charakter der Endotoxine verändern, können den Test stören. Die Interferenz äußert sich u.U. als Wiederfindung von erheblich größeren oder kleineren Endotoxinmengen, als nach Zugabe einer bekannten Menge an Standard-Endotoxin zur Probe zu erwarten ist (siehe „Grenzen des Verfahrens“). In den meisten Fällen führt eine Verdünnung der Probe zu einer verminderten Konzentration und Aktivität der Störsubstanzen bei weiterhin gültigen Testergebnissen. Die geeigneten Kontrollen und Verdünnungswerte werden im Abschnitt „Testverfahren“ besprochen. Proben sind so bald wie möglich nach der Entnahme zu testen. Es kann ratsam sein, unsterile Proben, die vor dem Test gelagert oder verschickt werden sollen, einzufrieren. Proben mit einer niedrigen erwarteten Endotoxinkonzentration sollten auf Endotoxinminderung während der Lagerung getestet werden.

#### Testverfahren

##### Mit Pyrochrome® gelieferte Testreagenzien

- Pyrochrome® (siehe Beschreibung oben unter „Reagens“ und „Vorgehen zur Rekonstitution“).
- Pyrochrome®-Rekonstitutionspuffer (nur Katalognummer C1500). Den Puffer wie oben beschrieben zur Rekonstitution von Pyrochrome® verwenden.
- Glucashield®-Rekonstitutionspuffer (nur Katalognummer CG1500). Den Puffer wie oben beschrieben zur Rekonstitution von Pyrochrome® verwenden.

##### Nicht mit Pyrochrome® gelieferte Testreagenzien

- Kontroll-Standard-Endotoxin (KSE). (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer EC010). Das KSE mit dem im Analysezertifikat (AZ, gibt die Wirkstärke des KSE an) angegebenen Volumen und nach den Anweisungen in der Packungsbeilage rekonstituieren. Die Anweisungen in der Packungsbeilage zur Verwendung und Lagerung von Standard-Endotoxin folgen. Die Wirkstärke des KSE wurde in Bezug auf das US-Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) bestimmt und ist auf dem AZ angegeben. Der Endotoxin-Referenzstandard nach USP (ident mit RSE) kann von U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., bezogen werden. Hinweis: Das AZ und die darauf angegebene Wirkstärke gehören zu einer bestimmten Kombination von Pyrochrome®- und KSE-Charge. Die gleiche Charge KSE kann beim Test mit Pyrochrome® aus verschiedenen Chargen bzw. mit Pyrotel oder LAL-Reagenzien anderer Hersteller u.U. verschiedene Wirkstärken (in EU/ng) aufweisen (1). Ebenso hat KSE aus verschiedenen Chargen beim Test mit Pyrochrome® aus der gleichen Charge wahrscheinlich verschiedene Wirkstärken. Darauf achten, dass das richtige AZ und die richtige Wirkstärke verwendet werden.

Das KSE zur Zubereitung von Standard-Endotoxinverdünnungen verwenden, mit denen Standardkurven erstellt werden und die als Positivkontrollen und Produkt-Positivkontrollen (Interferenzkontrollen) dienen.

- LAL-Reagenswasser (LRW). Empfohlene Bezugsquellen: Associates of Cape Cod, Inc. (verschiedene Packungsgrößen und -konfigurationen erhältlich) sowie andere. Im Handel erhältliches steriles Wasser für Injektionszwecke (steriles Wf) nach USP ohne Bakteriostatika oder Wasser zur Irrigation nach USP kann verwendet werden, vorausgesetzt, es ist nachweislich zur Verwendung als LRW geeignet. Der Endotoxin-Grenzwert für steriles Wf nach USP beträgt lediglich 0,25 EU/mL. Daher kann steriles Wf nachweisbare Mengen Endotoxine enthalten und zum Gebrauch ungeeignet sein.

Zum Nachweis der Eignung von Wasser als LRW muss es wie eine Probe mit einer Produkt-Positivkontrolle getestet werden (siehe Punkt 1.c. im Abschnitt „Kontrollen“). Zur Verdünnung von Standards und zur Zubereitung von Positivkontrollen zertifiziertes LRW verwenden (siehe Punkte 1.a. und 1.b. unter „Kontrollen“). Aus den Anlaufzeiten oder den Endpunktassays für die Standards eine Standardkurve erstellen. Der Korrelationskoeffizient muss mindestens 0,980 betragen (Absolutwert). Die Endotoxinkonzentration des getesteten Wassers lässt sich durch Extrapolation der Standardkurve unterhalb der niedrigsten Endotoxinkonzentration abschätzen und muss erheblich unter der des niedrigsten Standards liegen. Außerdem muss die Endotoxinkonzentration der Produkt-Positivkontrolle innerhalb von ± 25% des Wertes einer Positivkontrolle liegen.

- 50%ige Essigsäure (für die Endpunktmethode). Durch Zugabe von einem Volumenteil Eisessig zu einem gleichen Volumen destilliertem oder Umkehrosmose-Wasser zubereiten. (LRW – siehe oben unter 2. – kann verwendet werden, ist jedoch nicht notwendig.)

#### Material und Ausrüstung

- Mikrotiterplatten. Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und Abdeckung (erhältlich bei Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer CA961). Die Mikrotiterplatten müssen hinsichtlich des Endotoxin- bzw. Glukangehaltes zertifiziert sein oder getestet werden und dürfen den Test weder hemmen noch fördern. Mikrotiterplatte vor Verwendung überprüfen und Platte verwerfen, falls Kratzer oder andere optische Interferenzen am Boden der Vertiefungen (innen oder außen) beobachtet werden.

- Reaktionsröhrchen. Kinetische Assays können mit einem Röhrchen-Lesegerät mit Inkubator, beispielsweise mit Pyros Kinetix® Flex, unter Verwendung von entpyrogenisierten Kulturröhrchen der Größe 8 x 75 mm aus Borosilikatglas (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer TK100) durchgeführt werden. Die Endpunkt-Assays können in entpyrogenisierten Kulturröhrchen der Größe 8 x 75 mm oder 10 x 75 mm aus Borosilikatglas (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer TK100 bzw. TB050) durchgeführt werden.

- Fotometer, das bei 405 nm (bzw. 540 nm bei 550 nm bei der Azomethode) ablesen kann. Bei Anwendung der kinetischen Methode ein Plattenfotometer mit Inkubator wie beispielsweise das ELx808™ von BioTek® oder das VersaMax™ von Molecular Devices oder ein Röhrchen-Lesegerät wie das Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc. Katalognummer PKF32, PKF64 und PKF96) verwenden. Für die Endpunktmethode ein Plattenfotometer zur Ablesung der Mikrotiterplatten verwenden oder, wenn der Test in Röhrchen durchgeführt wird, ein Spektrofotometer mit entsprechenden Küvetten.

- Inkubator, der 37±1 °C einhalten kann (nur für die Endpunktmethoden notwendig). Ein Trocken-Blockinkubator für Mikrotiterplatten (bzw. Röhrchen) wird empfohlen. (Für die Endpunktmethode mit Teströhrchen kann ein Wasserbad verwendet werden.) Die Inkubatoren sollten eine nachweislich uniforme Wärmeverteilung aufweisen.

- Teströhrchenhalter zum Halten bzw. zur Inkubation von Verdünnungs- und Reaktionsröhrchen.

- Pipetten, Mikropipetten mit Pipettenspitzen (bei der Anwendung von Mikrotiter-platten sind Mehrkanalpipetten hilfreich) oder Mehrkanalpipetten mit Spritzen-zylinder aus Kunststoff. Empfohlen werden Einwegpipetten und -spitzen, die frei von störenden Endotoxinen bzw. Glukanen sind. Associates of Cape Cod, Inc., bietet die Produktlinie Pyroclear® an, die per Zertifikat frei von störenden Endotoxinen bzw. Glukanen ist.

- Vortex-Mixer.

- Parafilm M® (American National Can™). Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist typischerweise frei von nachweisbaren Endotoxinen.

- Teströhrchen, die frei von störenden Endotoxinen und ausreichend groß sind, um Endotoxinstandards bzw. Proben darin zu verdünnen. Angaben zu Behältern, die für Verdünnungen geeignet sind, siehe unter „Probennahme und -vorbereitung“.

- Heißluftofen, der bis auf mindestens 250 °C aufheizt, zur Entpyrogenisierung von Glasartikeln. Die üblichen Entpyrogenisierungszyklen gewährleisten, dass alle Artikel im Ofen mindestens 30 Minuten lang einer Temperatur von mindestens 250 °C ausgesetzt werden (2, 16, 17).

#### Kontrollen

Kontrollen sind für einen gültigen Test zwingend notwendig. Die FDA (1) und die USP (2), EP (3) und JP (4) haben empfohlene Verfahren ausgearbeitet.

##### 1.Endotoxinkontrollen.

a. Endotoxinstandardreihe. Für jeden Test einen neuen Satz Verdünnungen aus der Stamm-Endotoxinlösung zubereiten. Zuvor zubereitete und eingelagerte Verdünnungen dürfen nur verwendet werden, wenn die Stabilität dieses Konzentrationsbereiches nachgewiesen ist. Verdünnungen in geometrischer Reihe herstellen, so dass der erforderliche Endotoxin-Konzentrationsbereich erzielt wird. Für die Endpunktmethoden empfiehlt sich die Verdünnung auf das Doppelte. Für die kinetische Methode können höhere Verdünnungen verwendet werden. Die niedrigste Endotoxinkonzentration einer Standardreihe bildet jeweils die Nachweisgrenze des einzelnen Tests und wird mit λ bezeichnet (Hinweis: Bei Endpunkt- und kinetischen Tests sind mit Pyrochrome® Nachweisgrenzen von 0,005 bzw. 0,001 EU/mL möglich). Bei der Herstellung der erforderlichen Standardreihe die geringstmögliche Anzahl Verdünnungen und sachgemäße Pipettenvolumina verwenden, um höchstmögliche Genauigkeit zu erreichen. Die Verdünnungen können in Glas- oder geeigneten Kunststoffröhrchen oder direkt in einer Mikrotiterplatte hergestellt werden. Die mit Pyrochrome® nachweisbaren Maximalkonzentrationen hängen von der Methode ab. Als Richtwert gelten die für Pyrochrome® erhältlichen empfohlenen Inkubationszeiten.

b. Eine Positivkontrolle (eine einzelne Standard-Endotoxin-Konzentration) ist mitzuführen, wenn die Standardreihe (siehe oben unter a.) nicht auf die gleiche Weise wie die Produkt-Positivkontrollen zubereitet wird (siehe unten unter c.). Die Endotoxinkonzentration der Positivkontrolle sollte derjenigen eines Standards aus der Mitte der Standardkurve entsprechen. Ein Wert von 0,5 EU/mL wäre angemessen für Positivkontrollen, die mit einer Standardreihe aus den Konzentrationen 0,005, 0,05, 0,5,

