



Quantitative Endotoxinbestimmung

Einleitung

Endotoxine gehören zu der heterogenen Familie der Pyrogene (Box 1) und sind Bestandteile der äusseren Zellmembran gram-negativer Bakterien. Im Gegensatz zu Exotoxinen (z.B. Botulinum-toxin), lösen Endotoxine eine Immunreaktion nur aus, wenn das Bakterium lysiert (Zerfall der Zelle). Dabei werden Membranbestandteile freigesetzt, die vom menschlichem Immunsystem erkannt werden und eine Entzündungsreaktion auslösen. Das häufigste Symptom bei Kontakt mit Endotoxinen ist Fieber, da die Endotoxine die Ausschüttung von Cytokinen stimulieren. Weitere Reaktionen wie eine erhöhte Herzfrequenz oder die Abnahme der Anzahl an Lymphozyten und Blutplättchen können die Folge sein. Grosse Dosen an Endotoxinen können sogar zu Leberversagen oder Tod durch einen hämorrhagischen Schock führen. Wenn die Exposition bei einem gesunden Menschen über den Gastrointestinaltrakt verläuft, ist die durch Endotoxine ausgelöste Immunreaktion meist ungefährlich. Gelangen Endotoxine direkt in die Blutbahn, z.B. durch intravenös verabreichte, kontaminierte Medikamente, kann dies die oben beschriebenen Symptome auslösen.

Testprinzip

Um sicherzustellen, dass Arzneimittel wie z.B. intravenös verabreichte Antibiotika und andere Injektionslösungen frei von Endotoxinen sind, wird am häufigsten ein hoch sensitiver spezifischer

Assay angewendet, der auf dem Lysat von aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) gewonnenen Amöbozyten beruht. Amöbozyten sind das Pendant der wirbellosen Tiere zu den weissen Blutkörperchen der Wirbeltiere. Amöbozyten lösen beim Aufeinandertreffen mit einer fremden Substanz im Blutkreislauf eine Gerinnungsreaktion aus, die die fremde Substanz einschliesst und abtötet. Diese natürliche Reaktion wird heutzutage standardmässig für den Nachweis von Endotoxinen genutzt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Verfahren, die auf dieser Reaktion basieren.

Box 1:

Unterschied Pyrogene und Endotoxine

Pyrogen ist ein Sammelbegriff für entzündlich wirkende Stoffe, die eine Reaktion des Immunsystems bewirken. Sie können von mikrobiellen aber auch nicht-mikrobiellen Verunreinigungen stammen. Generell werden Pyrogene in zwei Gruppen eingeteilt: Endotoxine und Nicht-Endotoxin-Pyrogene (NEP). Während die Endotoxine ausschliesslich von gram-negativen Bakterien stammen, können die NEP von gram-positiven Bakterien, Viren, Hefen oder Schimmelpilzen stammen. Aber auch Stoffe nicht biologischen Ursprungs wie z.B. Kunststoffpartikel oder Metallverbindungen können als Pyrogen wirken. Bei Interesse zum generellen Nachweis von Pyrogenen stehen wir Ihnen gerne beratend zur Seite.

Tabelle 1: Testmethoden zur Bestimmung von Endotoxinen

	Gel-clot	Chromogen	Turbidimetrisch
Analyse	qualitativ oder semi-quantitativ	quantitativ	quantitativ
Messprinzip	visuell	photometrisch (Farbumschlag)	photometrisch (Trübung)
Referenz	Ph. Eur. 2.6.14, Methode A bzw. B	Ph. Eur. 2.6.14, Methode D bzw. E	Ph. Eur. 2.6.14, Methode C bzw. F
Vorteil	- technisch einfach - häufigste verwendete Methode	- sehr sensitiv (Detektionslimit bei 0.005 EU / mL) - automatische Datenerfassung - höhere Verdünnung ermöglicht Neutralisation von Störfaktoren	
Nachteil	- limitierte Sensitivität - anfällig für Erschütterungen	- technisch anspruchsvoller - Interferenz bei trüben oder gefärbten Proben	

Endotoxinbestimmung bei Interlabor Belp AG

Bei Interlabor wird neben dem Gel-Clot-Test neu standardmässig auch die chromogen-kinetische Methode angeboten, die eine quantitative Bestimmung des Endotoxingehalts ermöglicht. Das Testprinzip beruht auf der enzymatischen Abspaltung eines Chromophors (p-Nitroaniline) in Anwesenheit von Endotoxinen, was zu einer gelblichen Verfärbung der Lösung führt und photometrisch gemessen werden kann. Durch seine hohe Sensitivität ermöglicht der Test auch die Analyse von herausfordernden Probenmatrices, da Störfaktoren durch eine höhere Verdünnung neutralisiert werden können. Auf Anfrage bieten wir auch die turbidimetrische Methode an.

Analyse im Rahmen von GMP

Für eine quantitative Endotoxinbestimmung im Rahmen von GMP muss zuerst eine produktspezifische Verifizierung erfolgen. Im Rahmen von Vorversuchen prüfen wir die Löslichkeit sowie mögliche reaktionshemmende oder -fördernde Eigenschaften des Produkts. Basierend auf den Erkenntnissen aus den Vorversuchen wird dann die Verifizierung entsprechend der Kriterien der Pharmakopöe (Ph. Eur. 2.6.14¹ und USP <85>²) durchgeführt.

Eckdaten Endotoxinbestimmung bei Interlabor Belp AG

Je nach Projekt können unterschiedliche Analysenqualitäten und Bearbeitungszeiten angeboten werden:

- Analysenqualität: ISO 17025 oder GMP (nach Verifizierung)
- Bearbeitungszeit: Standard ca. 8 - 10 Arbeitstage oder Express ca. 5 Arbeitstage
Verifizierung ca. 8 - 12 Wochen
- Analysenpreis: Methoden-Setup CHF 120.- je Probenserie, Routine je Probe CHF 90.-
Kosten Verifizierung auf Anfrage
- Probenmenge: Routine ca. 1 g bzw. Verifizierung ca. 5 g;
Menge abhängig von der Spezifikation

Gerne beraten wir Sie in einem persönlichen Gespräch.

Quellen

1. <https://gmpua.com/Validation/Method/LAL/EUPHARMACOPEIA.pdf>
2. <https://www.usp.org/harmonization-standards/pdg/general-methods/bacterialendotoxins>

INTERLABOR BELP AG



Interlabor Belp AG

Aemmenmattstrasse 16
3123 Belp, Schweiz
Tel. +41 (0)31 818 77 77
www.interlabor.ch
info@interlabor.ch

Öffnungszeiten

Montag bis Freitag
07.30 – 12.00 Uhr
13.30 – 17.00 Uhr