

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

1855 Einführung der Injektionsspritzen

→ Möglichkeit, körperfremdes Material, z.B. Medikamente, parenteral zu verabreichen

Aber:

nach intravenösen Injektionen, häufiges Auftreten von Fieber, toxischen Symptomen bis hin zu Schockwirkungen und Tod

WARUM?

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Was sind Pyrogene? Was sind Endotoxine?

„Industriell hergestellte Stoffe sind gefährlich –
Naturstoffe sind gesund!“

Aber!

Nicht alles was in der Natur vorkommt, ist für den
Menschen bekömmlich.

z.B. - viele hochmolekulare Allergene (Pollen,
Tierhaare, Insektengifte...)

- Pyrogene (Bakterien- Endotoxine, Gummi-
Partikel...)

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

„Pyrogene“

aus dem griechischen *pyros* = Feuer

Stoffe, die entzündlich wirken, bei parenteraler Gabe Fieber erzeugen

Unterscheidung zwischen

exogenen Pyrogenen

- Bakterien- Endotoxine
- Partikel, wie Gummiabrieb oder mikroskopische Kunststoff- und Metallteilchen
- Steroide, Alkaloide

endogenen Pyrogenen

- fiebererzeugende Stoffe, die der Körper selbst produziert, z.B. Interleukine

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

„Endotoxine“ = stärksten Pyrogene

- aus dem griechischen **endo** = innen und **toxin** = Gift
- 1904 von Richard Pfeiffer – Schüler von Robert Koch-entdeckt
- nahm fälschlicherweise an, dass Endotoxine aus dem Inneren der Bakterien freigesetzt werden

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

- Endotoxine in der Zellwand gramnegativer Bakterien und Blaualgen
- Biochemisch: Lipopolysaccharide



fettähnliche Bestandteile

verschiedene Zucker

Lipid A, in Außenwand Bakterienzelle

= biologisch aktiver Teil, wirkt als Endotoxin

→ Freisetzung bei Zerstörung der Bakterien

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Endotoxine häufigste Kontaminationsquelle
medizinischer und pharmazeutischer Produkte

→ können, parenteral verabreicht, im menschlichen und tierischen
Organismus **toxische Reaktionen** verursachen.

→ parenterale Verabreichungen (Arzneimittel, Medizinprodukte)
dürfen nur **sehr geringe Mengen** an **Endotoxin** enthalten!!!

**Der Nachweis von Endotoxin im medizinischen und
pharmazeutischen Bereich ist unverzichtbar!**

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Nachweis von Endotoxin

- Kaninchentest (Ph.Eur., 2.6.8)
- Limulus- Amöbozyten- Lysat- Test (Ph.Eur., 2.6.14)
- Monocyten Aktivierungstest (Ph.Eur., 2.6.30)

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Kaninchentest (Ph.Eur., 2.6.8)

- injizieren der Testsubstanz
- registrieren der Körpertemperatur
- Temperaturanstieg = Indiz für das Vorhandensein von Pyrogenen

Nachteile:

- Eingeschränkt aussagekräftig, da Tiere oft unempfindlicher als Mensch auf fieberauslösende Substanzen reagieren
- Nicht alle Arzneimittelgruppen können getestet werden, weil Tiere diese nicht vertragen (z.B. bestimmte Antibiotika)



LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Limulus- Amöbocyten- Lysat- Test

LAL- Test (Ph.Eur., 2.6.14)

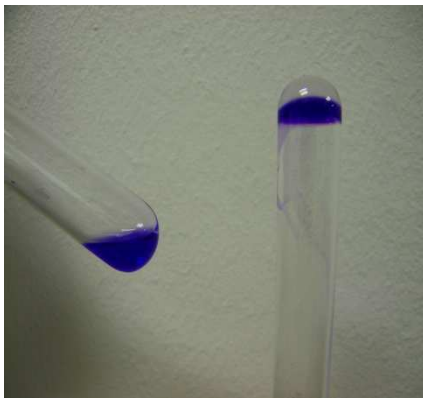


1956 Beobachtung, dass Infektion mit Gram-negativen Bakterien bei *Limulus polyphemus* (Pfeilschwanzkrebs) tödlich verlaufende intravaskuläre Gerinnung hervorruft

→ Entwicklung des Limulus- Amöbocyten- Lysat- Test (LAL- Test)

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene



Limulus- Amöbocyten- Lysat- Test

LAL- Test (Ph.Eur., 2.6.14)

- Lysatgewinnung aus Amöbozyten („blauen Blutkörperchen“) des Pfeilschwanzkrebse
- Koagulation/ Gerinnung des Lysats bei Vorhandensein von Endotoxin
- Herstellung verschiedener Lysatempfindlichkeiten, so dass quantitative Aussagen möglich
- Nachteile:
- nur Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Bakterien möglich
- Störsubstanzen

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Störsubstanzen:

- Elektrolyte (z.B. Kalzium, Phosphat), einfache Zucker in hohen Konzentrationen
- Antikoagulantien, z.B. Heparin, Citrat, EDTA
- Antibiotika, z.B. Penicillin, Tetracyclin
- Enzyminhibitoren, v. a. an SH- Gruppen
- Einige Saponine, Glycoside, Corticoide
- Einige Radiopharmaka
- Plasmaproteine, z.B. Albumine, Gammaglobuline,
- Ethanol (>2 %)

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Monocyten- Aktivierungstest (Ph.Eur., 2.6.30)

- Testsystem aus menschlichen Blut
- Ausnutzung des angeborenen Immunsystems des Menschen
- die im Blut enthaltenen Monocyten reagieren auf Pyrogene mit schneller und heftiger Produktion von Interleukin-1
- Menge der Ausschüttung in immunologischen Test (ELISA) mittels spezifischer Antikörper und enzymatischer Farbreaktion nachgewiesen

Nachteile:

- Hohe Kosten (Gefrierschrank bis -80°C, ELISA- Lesegerät + Software...)
- Längere Prüfdauer

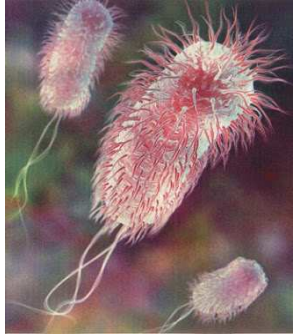


LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Endotoxin- Einheit:

- Endotoxin- Konzentration wird als **EU**(endotoxin unit) angegeben
- Einheit **EU** beschreibt die biologische Aktivität von Endotoxinen
 - **1 EU = 100 pg** (Pikogramm: 0,000000000001)
 - $1,0 \times 10^5$ (100.000) Bakterien sind ausreichend um 1 EU zu erzeugen!

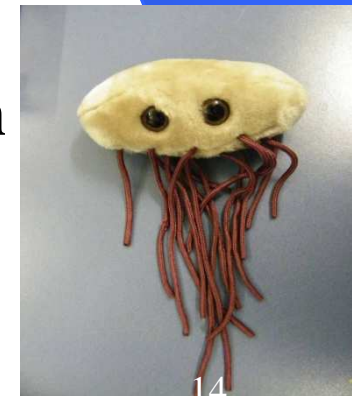


LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Darm des Menschen ca. 1000 g Gram- negative Bakterien
rund 50 g Endotoxine in Darmbakterien eines Menschen

- genug, um bei intravenöser Gabe eine Million Menschen mittels pyrogenem Schock umzubringen oder
- bei einer Milliarde Menschen Fieber auszulösen



LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

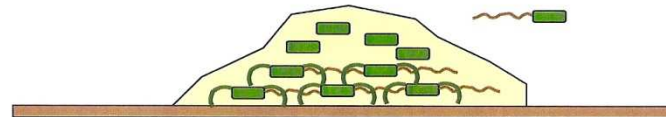
Wichtigste Quelle für Pyrogene in Wasser
Biofilmbildung durch z.B. *Pseudomonas aeruginosa*



Bewegliche Zellen
adhärieren an Oberfläche



Aggregation von Zellen
durch Pili zu Mikrokolonien



Bildung von Alginsäure-
schleimschicht um Mikrokolonie.
Äußere Zellen können sich davon
absetzen.

LAL- Test

bakterielle Endotoxine, Pyrogene

Anforderungen an Wasser, Medizinprodukte, Pharmazeutika

Wasser - VE- Wasser, Wasser für Injektionszwecke:

$\leq 0,25$ EU/ ml

Medizinprodukte:

$\leq 0,5$ EU/ ml = 20 EU/ Produkt

$\leq 0,06$ EU/ ml = 2,5 EU/ Produkt,

bei Produkten, die in Liquorraum gelangen

Pharmazeutika und flüssige Medizinprodukte:

≤ 5 EU/ kg Körpermasse

$\leq 0,2$ EU/ kg, für Produkte, die in Liquorraum gelangen

Intravenös für radioaktive Pharmazeutika :

$\leq 2,5$ EU / kg Körpermasse