



Einsatzmöglichkeiten des LAL-Tests (Parenteralia, Medizinprodukte, Dialyselösungen)

Michael Pfeiffer

B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Möglichkeiten des Einsatzes des LAL-Tests als Freigabetest für Parenteralia, Medizinprodukte und Dialyselösungen erläutert. Seit der Etablierung des LAL-Tests innerhalb der pharmazeutischen Industrie wurde die Möglichkeit seines Einsatzes anstelle des klassischen Pyrogentests am Kaninchen für die Freigabe von Parenteralia kontrovers diskutiert:

Die Befürworter des LAL-Tests argumentierten mit dessen höherer Empfindlichkeit, Schnelligkeit, geringem Preis und nicht zuletzt mit dem Wegfall von Tierversuchen.

Diejenigen, die einem Einsatz des LAL-Tests bei Freigabeprüfungen für Parenteralia reserviert gegenüberstanden, befürchteten vor allem, dass – auf Grund des sehr spezifischen Nachweises von Endotoxinen – nicht-endotoxin Pyrogene nicht mehr nachgewiesen werden könnten.

Seit einiger Zeit hat der LAL-Test in Europa jedoch Eingang in das Europäische (Deutsche) Arzneibuch gefunden und wird in der Monographie „Parenteralia“ bei den dort geforderten Prüfungen auf Reinheit verbindlich erwähnt.

1 Parenteralia

In der Monographie „Parenteralia“ der 10. Ausgabe des Deutschen Arzneibuchs (im folgenden als DAB 10 bezeichnet) ist der LAL-Test als Prüfung auf Bakterien-Endotoxine bei der Prüfung auf Reinheit erwähnt.

Unter dem Abschnitt „Prüfung auf Reinheit“ heißt es: Prüfung auf Bakterien-Endotoxine (V.2.19): „Die Prüfung auf Bakterien-Endotoxine kann die Prüfung auf Pyrogene ersetzen, wenn dies in einer Monographie des Arzneibuchs vorgeschrieben oder von der zuständigen Bundesoberbehörde zugelassen ist.“

Die im Geltungsbereich des DAB 10 bisher einzige Monographie, die den LAL-Test bei der Prüfung auf Reinheit an Stelle des üblichen Pyrogentests zulässt, ist die Monographie für „Wasser für Injektionszwecke“.

Da im DAB 10, im Gegensatz z.B. zum Britischen-(BP) oder dem US-Arzneibuch (USP), keine Monographien für Fertigarzneimittel, sondern nur allgemeine Monographien für bestimmte Darreichungsformen veröffentlicht werden, kann der pharmazeutische Unternehmer demnach nicht auf Monographien zurückgreifen. Er benötigt stattdessen die Zulassung der zuständigen Bundesbe-

hörde, wenn der LAL-Test den Pyrogentest ersetzen soll.

Die zuständige Bundesoberbehörde ist das ehemalige Bundesgesundheitsamt (BGA) und heutige Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte für neuzuzulassende Arzneimittel.

Für bereits zugelassene Arzneimittel ist eine Änderungsmeldung an das Bundesinstitut mit Beleg der ordnungsgemäßen Validierung der Prüfung auf Endotoxine meines Erachtens ausreichend (§ 29, Arzneimittelgesetz [AMG]). Der LAL-Test muß arzneimittelbezogen validiert werden. Die Validierungsunterlagen sollen von der zulassenden Behörde

Summary: Use of the LAL-Test (Parenterals, Medical Device, Dialysis solutions).

This article describes the use of the LAL-Test as a product release test for parenterals, medical devices and dialysis solutions. Since the LAL-Test has been established in the pharmaceutical industries, the possibility to use this test as product release test in lieu of the classical Test for Pyrogens in rabbits has been discussed:

The supporters of the LAL-Test argued with its high sensitivity, easy to use, low costs and last but not least with the possibility to avoid experiments with animals. Those who disapproved on the test to be used as a product release test mainly for parenterals feared that – due to the high specificity of the LAL-Test – non-endotoxin Pyrogens could no longer be detected.

Since some years the LAL-Test has been introduced into the monograph „Parenterals“ of the European (German) Pharmacopeia and is mentioned under the tests the parenterals have to comply with.

Keywords: LAL-Test, endotoxins, parenterals, product release test



Tabelle 1: Extraktion von Endotoxinen vor und nach Sterilisation. Zehn-Milliliter-Sprizen wurden mit gramnegativen Keimen künstlich kontaminiert (Extraktionmethode: DIN 13098)

Endotoxin	CFU / Syringe	LAL Test before Sterilization	Steam	LAL Test after Sterilization	
				Ethylene Oxide	Irradiation (g)
P. aeruginosa	~ 10 ³	9 / 0 (3 / 3)*	3 / 0 (1 / 0)	3 / 0 (1 / 0)	3 / 0 (1 / 0)
	~ 10 ⁵	9 / 9 (3 / 3)	3 / 3 (1 / 0)	3 / 0 (1 / 0)	3 / 3 (1 / 0)
	~ 10 ⁷	9 / 9 (3 / 3)	3 / 3 (1 / 0)	3 / 0 (1 / 0)	3 / 3 (1 / 0)
E. coli	~ 10 ³	9 / 0 (3 / 3)*	3 / 2 (1 / 0)	3 / 0 (1 / 0)	3 / 0 (1 / 0)
	~ 10 ⁵	9 / 9 (3 / 3)	3 / 3 (1 / 0)	3 / 1 (1 / 0)	3 / 3 (1 / 0)
	~ 10 ⁷	9 / 9 (3 / 3)	3 / 3 (1 / 0)	3 / 2 (1 / 0)	3 / 3 (1 / 0)

bei der Entscheidung über Zulassung oder Nichtzulassung des LAL-Tests in Erwägung gezogen werden. Weiterhin ist der Nachweis zu erbringen, daß bei positiven Befunden im Pyrogentest gleiche Ergebnisse wie mit dem LAL-Test erbracht werden.

Auf der anderen Seite ist sicherzustellen, daß ein negativer Pyrogentest auch einen negativen LAL-Test bedingt. Diese Forderung ist nur scheinbar ein Widerspruch (ein negativer Pyrogentest kann ohne weiteres, auf Grund der höheren Empfindlichkeit des LAL-Tests, durch ein positives Ergebnis des letzteren widerlegt werden). Vielmehr muß ausgeschlossen werden, daß auf Grund der (sehr hohen) Spezifität des LAL-Tests pyrogene Substanzen, die ev. von anderen als gramnegative Keime sezerniert werden, zwar vorhanden sind, aber mit dem LAL-Test nicht nachgewiesen werden können.

2 Medizinprodukte („Medical Devices“)

Durch das zweite Gesetz zur Änderung des Arzneimittelgesetzes vom 16. August 1986 wurden Einmalarti-

kel (= Medizinprodukte oder *Medical Devices*) in das Arzneimittelgesetz mit einbezogen, sofern aus ihrer Kennzeichnung hervorging, daß sie einem Verfahren zur Verminderung der Keimzahl unterzogen worden sind (§ 2 [2] AMG). Seitdem (1.1.88) gelten sterile Einmalartikel als Arzneimittel und unterliegen somit den Qualitätsanforderungen des Arzneibuchs (§ 55 AMG), sofern sie dort aufgeführt sind.

Zum 1.1.1995 trat das neue Medizinproduktegesetz (MPG) in Kraft. Ab diesem Datum kann bis zum Ende einer Übergangsfrist am 13.6.1998 für Medizinprodukte, die bisher unter § 2 (2) AMG fielen, alternativ zum Arzneimittelgesetz auf der Basis einer Interimsregelung das Medizinproduktegesetz unmittelbar angewendet werden.

Ab dem 14.6.1998 fallen dann alle Produkte, die durch die Begriffsbestimmungen (§ 3 MPG) abgedeckt sind, unter das MPG.

Während für (klassische) Arzneimittel das Arzneibuch das anerkannte pharmazeutische Regelwerk über Qualität, Prüfung, Lagerung, Abgabe und Bezeichnung von Arzneimitteln ist (§ 55 AMG), konkretisieren bei den Medizinprodukten harmonisierte

europäische Normen diese Anforderungen (klinische Prüfungen, Überwachung etc.). Für Medizinprodukte, die im Arzneibuch aufgeführt sind (z.B. Transfusionsgeräte, Einmalspritzen etc.), gelten auch weiterhin die Qualitätsanforderungen des Arzneibuchs, auch über den 14.6.1998 hinaus, sofern sie nicht aus dem Arzneibuch herausgenommen werden (Ratsrichtlinie 75/318/EEC vom 20.5.1975 in der jeweils neuesten Fassung).

Für Transfusionsgeräte und für Einmalspritzen mit einem Nennvolumen ≥ 15 ml z.B. schreibt das Arzneibuch die Prüfung auf Pyrogene (V.2.1.4) vor, ohne die Möglichkeit der alternativen Prüfung auf Bakterien-Endotoxine, wie sie z.B. für Parenteralia beschrieben ist.

Die englische MEDISPA (*Medical Sterile Products Association*) schreibt in ihren „Draft Guidelines for the Assessment (and Control) of Microbial Contamination“ (Bioburden) (2/1989) „...that plastic devices that are manufactured and validated under GMP guidelines are liable to have such a low precontamination bacterial count that testing of products for pyrogenicity is not considered essential...“.

In einem Modellversuch mit 10 ml Einmalspritzen, die mit den Endotoxinbildnern *P. aeruginosa* bzw. *E. coli* kontaminiert waren, mußte man die Spritzen mit 10³–10⁵ Keimen/Spritze beaufschlagen, um überhaupt – in Abhängigkeit von der Sterilisationsart – ein positives LAL(!)-Ergebnis zu erhalten. Der Pyrogentest ist noch weitaus unempfindlicher, so daß ein positives Ergebnis bei der

Tabelle 2: Vergleich der Nachweishäufigkeit Endotoxin-positiver Kunststoffeinmalartikel mit Hilfe des Pyrogen- und des LAL-Tests

Anzahl Tests	Anzahl positiver Tests
LAL-Test: 5484*	8 (0,15 %)**
Kaninchentest: 152	0 (0,00 %)

* Prüflinge

** nachgezogene Pyrogentests: negativ

Tabelle 3: Ergebnisse einer parallelen Testung von insgesamt 77 Chargen Aqua a. i., 0,9 % NaCl-Lösung und Ringer-Spüllösung (3/81–12/81)

Produkt	Pyrogen-Test		LAL-Test	
	negativ*	positiv	negativ	positiv
Aqua a. i.	17	0	17	0
NaCl-Lösung 0,9 %	47	0	39	8
Ringer-Spüllösung DAB 7	12	1	7	6
Summe	76 (98,7 %)	1 (1,3 %)	63 (81,8 %)	14 (18,2 %)

* 1,15° C ≤ ΣT ≤ 2,65° C

Prüfung auf Pyrogene erst bei noch höheren Keimzahlen hätte erwartet werden können.

Über einen Zeitraum von neun Monaten wurden 600 2- und 3-teilige Einmalspritzen auf Verkeimung vor der Sterilisation untersucht:

Hierbei ergab sich, daß 2/3 aller untersuchten Spritzen vor der Sterilisation praktisch keimfrei waren, während nur zwei von 600 Spritzen Keimzahlen zwischen 20 und 50 aufwiesen. Aber auch diese letzteren Keimzahlen hätten in keinem Fall ausgereicht, um ein positives Pyrogen-/LAL-Ergebnis zu bewirken.

1986 wurden bei Braun in Melsungen ca. 5500 Medizinprodukte mit dem LAL- und 150 Medizinprodukte mit dem Pyrogentest geprüft. Nur in acht Fällen konnten positive LAL-Reaktionen nachgewiesen werden; die anschließend durchgeführten Pyrogen-Prüfungen waren alle negativ.

3 Hämodialyselösungen und Wasser zum Verdünnen konzentrierter Hämodialyselösungen

Hämodialyselösungen entsprechen in ihrer Elektrolytkonzentration derjenigen des menschlichen Plasmas. Wegen der Verwendung großer Volumina werden Hämodialyselösungen normalerweise mit Wasser geeigneter Qualität vor Gebrauch verdünnt.

Wasser geeigneter Qualität ist „Gereinigtes Wasser“ nach Arzneibuch, an das allerdings noch besondere Anforderungen (u.a. an Mikrobiologie und Endotoxingehalt) gestellt werden.

Falls „Gereinigtes Wasser“ nicht erhältlich ist, kann für die Heimdialyse auch Trinkwasser zum Verdünnen der Konzentrate verwendet werden.

Hämodialyselösungen dürfen höchstens 0,5 Endotoxineinheiten (EU)/ml Lösung enthalten, wenn sie, auf Anwendungskonzentration verdünnt, mit der Prüfung auf Bakterien-Endotoxine geprüft werden.

Das Arzneibuch weist jedoch auch darauf hin, daß *Konzentrate*, bei denen keine validierte Prüfung auf Bakterien-Endotoxine durchgeführt werden kann, mit dem Pyrogentest zu testen sind (in diesem Fall auf Anwendungskonzentration verdünnt).

Die Formulierung des Arzneibuchs ist somit äußerst widersprüchlich:

So kann ausgelegt werden, daß das *Konzentrat zu validieren* und die *Routineprüfung in der Anwendungskonzentration* durchzuführen ist, da einmal von *Prüfung* und einmal von *Validierung* gesprochen wird.

Die Pyrogenprüfung hingegen wird nur in der Anwendungskonzentration durchgeführt. Der Kommentar des Arzneibuchs (1994) zu diesen

Prüfkriterien beendet deren Widerspruchlichkeit: Er legt fest, daß sowohl die Validierung als auch die Prüfung an den auf die jeweilige Gebrauchskonzentration herabverdünnten Konzentraten durchzuführen sind und erst danach entschieden werden kann, ob der Limulus-Test oder der klassische Kaninchen-Test angewendet werden muß.

Wasser zum Verdünnen konzentrierter Hämodialyselösungen ist „Gereinigtes Wasser“, dessen mikrobiologische Qualität und Endotoxinbelastung, anders als bei normalerweise im Arzneibuch beschriebenen „Gereinigten Wasser“, angegeben sind:

Die mikrobiologische Qualität entspricht Trinkwasser (100 Keime/ml) und die Endotoxinbelastung derjenigen von Wasser für Injektionszwecke (≤ 0,25 EU/ml).

Gleichzeitig läßt das Arzneibuch Trinkwasser zum Verdünnen der Hämodialysepräparate zu. Der entsprechende Kommentar weist darauf hin, daß nur Trinkwasser zur Anwendung kommen darf, dessen chemische Zusammensetzung besonders sorgfältig überprüft worden ist. Die Interpretation des Kommentars diesbezüglich ist jedoch wiederum schwierig:

Er besagt, daß bei Wasser zum Verdünnen von Hämodialysekonzentraten, zusätzlich zu den Reinheitsprüfungen bei „Gereinigtem Wasser“, noch Gesamtchlor, Fluorid, Kalium, Quecksilber, Zink, Mikrobiologie und Bakterien-Endotoxine geprüft werden müssen. Im nächsten Absatz wird auf Trinkwasser verwiesen, und es werden entsprechende Reinheitsprüfungen auf Gesamt-

Tabelle 4: Anzahl Chargen 0,9 % NaCl-Lösung, die – im Gegensatz zum Pyrogen-Test – im LAL-Test ein positives Ergebnis zeigten (1985–1990)

	Anzahl Chargen	Anzahl mit dem LAL-Test positiver Chargen (≥ 0,5 EU / ml; %)
Spüllösung	797	1 (0,13)
Bottle Pack-Verfahren	1656	5 (0,3)
Infusionsflaschen (250–1000 ml)	1005	0 (–)
Injektionsflaschen (≤ 100 ml)	664	0 (–)
Soluflex-Beutel	718	2 (0,28)
Summe	4840	8 (0,17)

chlor, Fluorid, Kalium, Natrium und Zink verlangt. Auf eine Quecksilberprüfung z.B. wird verzichtet, mit Hinweis auf die Quecksilberlimitierung im Trinkwasser durch die entsprechende EG-Verordnung. Es läßt sich auf Grund des Wortlauts des Kommentars nicht eindeutig entscheiden, ob die Mikrobiologie und/oder die Bakterien-Endotoxine bei Verwendung von Trinkwasser für die Hemodialyse zu überprüfen sind oder nicht.

Bei der Mikrobiologie könnte man schlußfolgern, daß die Keimzahl/ml ebenfalls durch die entsprechende Trinkwasserverordnung geregelt ist.

Endotoxingehalte sind jedoch nirgends beschrieben, so daß u.U. interpretiert werden könnte, Trinkwasser nur nach vorheriger Endotoxinprüfung für die Hemodialyse zu verwenden.

Eine Endotoxinkonzentration \leq 0,25 EU/ml ist bei Trinkwasser allerdings kaum zu erwarten noch zu erreichen. Eigene Untersuchungen mit Melsunger Stadtwasser ergaben Endotoxinkonzentration zwischen 3 und 10 EU/ml. Würde man dieses

Wasser für den Ansatz bei der Hemodialyse verwenden, würde der Endotoxineintrag des verdünnten Konzentrats, der lt. Arzneibuch auf 0,5 EU/ml limitiert ist, nur noch ^a 5 % der Gesamtdotoxinbelastung bei der Anwendungskonzentration betragen. Dann ist allerdings die Frage erlaubt, warum an die Hämodialyselösungen generell so rigide Anforderungen hinsichtlich Endotoxinbelastung gestellt werden müssen.

5 Literatur

- Deutsches Arzneibuch (DAB), 10. Auflage. (1991).
- VIII.9 Wasser zum Verdünnen konzentrierter Hämodialyselösungen (1. Nachtrag 1992)
 - Monographie Hämodialyselösungen (2. Nachtrag 1993)
 - Monographie Parenteralia (Grundlfg. 1991)
 - VI.2.2.4 Sterile Einmalspritzen aus Kunststoff (Grundlfg. 1991)
 - VI.2.2.2.4 Transfusionsbestecke für Blut und Blutprodukte (Grundlfg. 1991)
 - mit den jeweiligen Kommentaren

Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG). (1991). Aulendorf: ECV-Editio Cantor Verlag.

Medical Sterile Products Association (MEDISPA). (February 1989). *Draft Guidelines for the Assessment (and Control) of Microbial Contamination* (Bioburden). United Kingdom.

Medizinproduktegesetz (MPG). (1994). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Pfeiffer, M. (1990). Testing Medical Disposables Using the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Test. *Medical Device Technology*, May / June 1990, 37-51.

Pfeiffer, M., Böhner, S. und Koppensteiner, G. (1993). Nachweis von Endotoxinen in Parenteralia mit dem Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test. *Pharm. Ind.* 54, 11, 960-963.

Scheer, R. (1989). *Der Limulustest*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Korrespondenzadresse

Michael Pfeiffer
B. Braun Melsungen AG
(Sparte Medical)
Postfach 110
D-34209 Melsungen

Der Limulus-Amöbozyten-Lysat-(LAL)-Test als Ersatzmethode für den Pyrogentest am Kaninchen

29. ZEBET Seminar am 29. November 1994 in D-Berlin

Unter diesem gemeinsamen Titel sind hier vier Referate eines Workshops bei ZEBET/BgVV in Berlin über den Stand der Anwendungsmöglichkeiten und der behördlichen Akzeptanz des LAL-Tests zusammengestellt. Das fünfte Referat aus dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte in Berlin, zuständig für die Anerkennung dieser Alternativmethode in Deutschland, wurde uns leider nicht zur Verfügung gestellt. Organisiert wurde das Seminar gemeinsam von ZEBET/BgVV und der Fa. SERVA, Heidelberg.