

dosis. Die Prüfung auf Pyrogene bzw. bakterielle Endotoxine erfolgt nach Ph. Eur. im LAL.

Bei den Testungen im humanen Vollblutassay zeigte der inaktivierte Tollwutimpfstoff keine Induktion von Interleukin-1-ß-Ausschüttung und maskierte die durch Standardpyrogen induzierte Interleukinausschüttung bis zu einer Verdünnung von 1:10.

Der Gelbfieberimpfstoff induzierte selbst eine Zytokinausschüttung, die bei einer Verdünnung von 1:100 messbar war, eine Maskierung des Standardpyrogens war nicht sichtbar.

3.4 Blutgerinnungsfaktoren

Blutgerinnungsfaktoren werden intravenös appliziert. Die Prüfung auf Pyrogene erfolgt nach Ph. Eur. im Kaninchenpyrogentest.

Im humanen Vollblutassay zeigten einzelne Präparate (Kaninchenpyrogentest negativ) eine Interleukininduktion, die sich ab einer Verdünnung von 1:10 verlor. Eine im Kaninchenpyrogentest aufgetretene Pyrogenität (Temperaturdifferenz über 3 Tiere = 3,65° C) wurde im humanen Vollblutassay sicher erkannt (Interleukinausschüttung fünfzigfach höher als die Negativwerte), wenn das Präparat unverdünnt eingesetzt wurde.

4 Schlußfolgerungen

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der humane Vollblutpyrogentest für biologi-

sche Arzneimittel prinzipiell geeignet ist. Es ist aber für jedes biologische Arzneimittel aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung eine Validierung notwendig. Mit dem Vollblutpyrogentest können Verunreinigungen mit LPS sicher und mit ausreichender Sensitivität erkannt werden. Aber nicht nur LPS als Oberflächenbestandteil gramnegativer Bakterien, sondern auch andere Substanzen können als exogene Pyrogene wirksam werden. Da die Pyrogene mit Ursprung in Viren, Pilzen, Parasiten und grampositiven Bakterien in ihrer Natur unbekannt sind, kann auch wenig über ihr fiebererzeugendes Potential in verschiedenen Spezies gesagt werden. Die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des humanen Vollbluttests und dem Kaninchenpyrogentest bedürfen einer sorgfältigen Prüfung ihrer Ursachen (s. auch Hartung et al. in diesem Heft weiter unten). Der Kaninchenpyrogentest ist zwar ein Test für den umfangreiche Erfahrungen aus der Praxis vorliegen, aber wie bei jedem Tierversuch bleibt bei der Übertragung der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen ein Interpretationsspielraum. Der Vollblutpyrogentest hat demgegenüber den Vorteil, im homologen System zu arbeiten. Bei den hier beobachteten Interleukinausschüttungen ist es durchaus möglich, daß dies auch mit einer Fieberreaktion beim Menschen korreliert, wenn der Kaninchenpyrogentest negativ ausgefallen war. Umgekehrt ist es auch denkbar, daß trotz einer Fieberreaktion im Kaninchen der Mensch nicht mit Fieber reagiert. Die fehlende Interleukin-1-ß im Vollblutpyrogentest ist ein Hinweis in diese Richtung.

Der Vollblutpyrogentest ist also nicht nur potentiell in der Lage, den Kaninchenpyrogentest abzulösen, sondern kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auch helfen, bisher unklare Fieberreaktionen aufzuklären.

Literatur

Bundesanzeiger (1993). Bundesanzeiger 2 vom 6.1.1993, S. 63.

Ph. Eur. (1997). Europäisches Arzneibuch, 3. Ausgabe (1997). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag. Eschborn: Govi-Verlag- Pharmazeutischer Verlag GmbH.

Hartung T. und Wendel A. (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX 12*,70-75.

FDA Interims Guidance (1991). U.S. Food and Drug Administration. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte test as an in-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. DHHS, Dec. 1987, and Interims Guidance, 1991.

Korrespondenzadresse

Matthias Fischer Paul-Ehrlich-Institut Abteilung Bakteriologie Paul-Ehrlich-Str. 51-59 D-63225 Langen

E-mail: M.Fischer@em.uni-frankfurt.de



Prävalidierung von Parenteralia im humanen Vollblutmodell

Markus Weigandt, Peter Lexa und Hans-Günther Sonntag Hygiene-Institut der Universität Heidelberg, D-Heidelberg

Zusammenfassung

Im humanen Vollblut-Pyrogentest wird zum Nachweis von Pyrogenen die dem natürlichen Fiebermechanismus entsprechende pyrogeninduzierte Ausschüttung von IL-1 β als Prüfkriterium herangezogen.

Um den Kaninchen-Pyrogentest als bisherige offizielle Standardmethode zu ersetzen, sind Untersuchungen zur Validierung des Vollblut-Pyrogentests nötig. Dabei konnten unter Einbeziehung einer größeren Spenderpopulation die folgenden Ergebnisse dargestellt werden:

1) In Blutproben ohne LPS (Pyrogen)-Stimulation ließ sich kein IL-1 β nachweisen.

2) Stimulation mit LPS ergibt eine konzentrationsabhängige Ausschüttung von IL-1β, wobei unabhängig von den individuellen Blutproben eine Mindestkonzentration von 2-5 pg/ml LPS von S. abortus equi erforderlich ist.

3) Die absolute Menge des ausgeschütteten IL-1 β variiert interindividuell deutlich.



4) Die Verlängerung der Lagerungszeit der Blutproben vor ihrem Einsatz im Testsystem bewirkt eine Erhöhung der erforderlichen minimalen LPS-Konzentration für die Ausschüttung von IL-1β und eine deutlich höhere IL-1β-Ausschüttung bei der Stimulation mit hohen LPS-Konzentrationen im Vergleich zum Einsatz mit Frischblut.

Für die Testauswertung wird eine Anlehnung an die Vorschrift der semiquantitativen LAL-Gelbildungsmethode des Europäischen Arzneibuchs empfohlen.

Bei der Überprüfung von Infusionslösungen ließen sich auf dieser Evaluationsbasis die für den LAL-Test vorgeschriebenen Endotoxingrenzwerte darstellen. In dotierten Proben der Infusionslösungen wurde das LPS in den zugegebenen Konzentrationen wiedergefunden.

Summary: A new test for the detection of pyrogens in pharmaceutical products. Examinations for the validation of the human whole blood assay

The human whole blood assay utilises the natural fever response to detect pyrogens by determination of the release of IL-1 β .

In order to replace the official method, the rabbit pyrogen test, a validation of the whole blood assay is necessary. A comparison of the results obtained from many blood samples has revealed the following:

- 1) Blood not stimulated by LPS does not produce IL-1 β .
- 2) Stimulation by LPS induces a concentration-dependent release of IL-1 β beginning at a concentration of between 2-5 pg/mL LPS.
- 3) The amount of IL-1 β released varies greatly between samples obtained from different individuals.
- 4) Storing blood samples results in a right shifted LPS/IL-1β curve with a steeper gradient and higher maximum value of IL-1b. In this paper we suggest an experimental method for the determination of pyrogens based on the established semi-quantitative LAL gelation method as detailed in the European Pharmacopeia.

Using this methodology, we were able to show that the amount of endotoxin in a number of different infusion solutions was below the LAL-endotoxin limit concentration. LPS was quantitatively determined from spiked samples.

Keywords: human whole blood, alternative method, interleukin-1\beta, drug release, pyrogen test

1 Einleitung und Fragestellung

Parenteralia müssen frei sein von Stoffen (Pyrogenen), die durch Fiebererzeugung den Patienten schädigen können. Zur Überprüfung der Pyrogenfreiheit dient seit über fünfzig Jahren der Test an Kaninchen. Als in vitro Ersatzmethode wird seit vielen Jahren auch der LAL-Test eingesetzt. Die damit möglich gewordene semiquantitative Bewertung, zusammen mit einer hohen Sensitivität, brachten für den Endotoxinnachweis eine deutliche Verbesserung der Arzneimittelsicherheit mit sich (Krüger, 1981). Trotz seiner Überlegenheit in diesen und auch anderen Punkten konnte er den Kaninchentest nicht vollständig ersetzen. Dies liegt vor allem daran, daß sich nicht alle Arzneimittel wegen Interferenzen zwischen Reagenz und Probe testen lassen. Zudem sind im Rahmen der Validierung von Arzneimittelherstellungsprozessen Kaninchentests nötig, um neben Endotoxinen auch andere Pyrogene auszuschließen. Seit Mitte der achtziger Jahre finden sich daher in der Literatur Vorläufer des nunmehr zur Verfügung stehenden Vollblut-Pyrogentests. Dinarello et al. (1984) verwendeten separierte Leukozyten, Poole et al. (1988) leukozytäre Zellinien, deren Zytokinausschüttungen zum Pyrogennachweis genutzt wurden. Alle diese Methoden waren aber zu komplex und vor allem zu störungsanfällig, um sich gegen die etablierten Verfahren durchsetzen zu können.

Der von Hartung und Wendel (1995) beschriebene humane Vollblut-Pyrogentest nutzt die dem natürlichen Fiebermechanismus des Menschen entsprechende pyrogeninduzierte Freisetzung von IL-1B aus. Die Leukozyten im Blut reagieren auf pyrogene Substanzen u.a. mit der Ausschüttung von IL-1ß, welches durch den Blutkreislauf zu bestimmten Gefäßendothelzellen im Hypothalamus gelangt. Nach Signaltransduktion durch PGE, wird die Solltemperatur im Hypothalamus erhöht; der Mensch reagiert mit Fieber (Dinarello, 1996). Der humane Vollblut-Pyrogentest stellt den ersten Teil dieses Ablaufs in vitro nach: Menschliches Vollblut wird mit der Prüflösung versetzt, eventuell vorhandene Pyrogene induzieren eine IL-1β-Ausschüttung, die mittels ELISA gemessen

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, eine Reihe von methodischen Parametern dieses Testsystems zu validieren und seine Praktikabilität an pharmazeutischen Routineproben zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Für die Untersuchungen kamen folgende Reagenzien zur Anwendung:

- Vollblut wurde von Blutspendern (Blutbank des Universitätsklinikums Heidelberg) zur Verfügung gestellt.
- Der Kontrollstandard Endotoxin-NP-3 aus *S. abortus equi* wurde von der GMN Walldorf bezogen.
- Als Verdünnungsmedium wurde 0,9%
 NaCl-Lösung der Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen verwendet.
- Als ELISA kam der ELISA-Kit Milenia® Pyrocheck, Firma DPC Biermann, Bad Nauheim, zum Einsatz.

2.2 Versuchsansatz zum Nachweis von Pyrogen mit Vollblut

Unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus, Hanau) wurden in 1,5 ml Polypropylen-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) 1000 µl 0,9%ige NaCl-Lösung vorgelegt. Von dem Kontrollstandard NP-3 wurde eine Verdünnungsreihe von 1-100 ng/ml LPS hergestellt. 100 µl einer dieser Verdünnungen oder 100 µl der Prüflösungen wurden in je ein Reaktionsgefäß zugegeben. Das Blut eines gesunden Spenders wurde in Li-Heparin-Monovetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt und jeweils 100 µl in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank über Nacht bei 37° C, 20% O, und 5% CO. Nach Aufschütteln des Sediments und Zentrifugation (3200 g, 1 min) wurde der IL-1b-Gehalt mittels des ELI-SA-Kit Milenia® Pyrocheck bestimmt.



2.3 Bestimmung der individuellen pyrogeninduzierten Reaktivität der Blutspender

In jedem Versuchsansatz wurden die Vollblutproben sowohl pyrogenfrei (mit ausschließlich NaCl-Lösung) als auch mit Verdünnungen von Kontrollendotoxin inkubiert. Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn die durch IL-1b-induzierte optische Dichte im ELISA um mindestens den Faktor 5 höher lag als bei den pyrogenfreien Proben. Die geringste LPS-Konzentration, die diesen Wert erreichte, wurde in pg/ml LPS-Äquivalent angegeben und als Blutsensitivität D_{sens} bezeichnet.

2.4 Interferenzprüfung

Die jeweils individuell bestimmte Blutsensitivität wurde bei der Auswertung der Prüfsubstanzen, die in verschiedenen Verdünnungen getestet wurden, bestimmt. Eine Prüfsubstanzverdünnung galt dann als interferenzfrei, wenn sie die Blutsensitivitäten nicht deutlich beeinflußte. Zusätzlich wurde die Prüfsubstanz ohne Vollblut direkt in eine ELISA-Kavität gegeben, um eine Interferenz zwischen ELI-SA-System und Prüfsubstanz zu erkennen.

2.5 Untersuchungen zum Pyrogennachweis in Prüfsubstanzen

Für die semiquantitative Messung wurde die Prüfsubstanz in den Verdünnungen, die als interferenzfrei ausgetestet waren, eingesetzt. Der Verdünnungsfaktor der höchsten positiven Verdünnung $V_{\rm hoch}$ und der niedersten negativen Verdünnung $V_{\rm niedr}$ wurden festgestellt. Der Endotoxingehalt $C_{\rm ET}$ wurde nach der Formel

$$C_{\text{ET}}$$
 wurde nach der Formel $D_{\text{sens}} \times V_{\text{hoch}} < C_{\text{ET}} < D_{\text{sens}} \times V_{\text{niedr}}$

Für die Auswertbarkeit eines Tests mußten folgende Kriterien erfüllt sein:

- Die Negativproben unter 2.3 zeigten keine IL-1b-Ausschüttung.
- Die unter 2.5 eingesetzten Prüfsubstanzverdünnungen waren interferenzfrei und, zum Bestehen der Prüfung,
- die äquivalente Endotoxinkonzentration der Probe lag unter dem Grenzwert.

Nachfolgend aufgeführte Arzneimittel wurden getestet:

- wäßrige Glukose 2,5% / NaCl 0,45%-Lösung, Universitätsapotheke Heidelberg
- wäßrige Glukose 5%-Lösung, Universitätsapotheke Tübingen
- Ringer Lösung Rentschler, Dr. Rentschler GmbH & Co., Laupheim

- Longasteril[®] 40 kochsalzhaltig (Volumenersatzmittel auf Dextranbasis), Fresenius AG, Bad Homburg
- Thomaemin® hepar (Aminosäurengemisch), Delta-Pharma GmbH, Pfullingen
 −<Gelafundin® (Volumenersatzmittel auf Gelatinebasis), B. Braun Melsungen AG, Melsungen

2.6 Wiederfindungsversuche

Vier der sechs Prüfsubstanzen wurden mit LPS dotiert und einer regulären Messung, wie unter 2.5 beschrieben, unterzogen.

2.7 Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von Blutproben

Bei vier Spendern wurde ein Teil des Blutes frisch in einem Versuch eingesetzt, der Rest in einer Monovette im Kühlschrank (8° C) gelagert und einen oder zwei Tage später in einem Versuch verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß der individuellen Blutspenderproben auf die pyrogeninduzierte IL-1β-Freisetzung

Die Ergebnisse der pyrogeninduzierten Ausschüttung von IL-1 β im Vollblut von zehn individuellen Blutspendern sind in Abbildung 1 dargestellt. Dabei wird deutlich, daß nicht mit LPS dotiertes Blut kein IL-1 β freisetzt; in keinem Fall trat eine spontane Ausschüttung von IL-1 β auf.

Auch Anwesenheit von bisher geprüftem pyrogenfreiem Probenmaterial änderte dies nicht. Die Freisetzung von IL-1β setzte ein ab 10 pg/ml LPS (angegeben wird die externe LPS-Konzentration; im Kulturgefäß wird diese auf 1/12 verdünnt). Ab 50 pg/ml LPS schüttete jedes Blut deutlich IL-1b aus. Der minimale Konzentrationsbereich von Pyrogenen, bei dem IL-1b freigesetzt wird, ist somit eng begrenzt und variiert interindividuell nur gering. Oberhalb dieses Bereichs zeigte das Blut eine ausgeprägte Dosis-Wirkungsbeziehung, d. h. durch höhere LPS-Konzentrationen wird mehr IL-1b ausgeschüttet. Ab ca. 10 ng/ml LPS kommt es zu einer Plateaubildung, höhere Konzentrationen, eingesetzt wurden Konzentrationen bis 100 ng/ml, bewirkten keine weitere Erhöhung an IL-1b mehr. Deutliche individuelle Unterschiede zeigten sich allerdings in der absoluten Menge der Freisetzung von IL-1β. Bei einer LPS-Konzentration von 1000 pg/ml LPS konnte so z. B. eine Freisetzung von IL-1β zwischen 410 bis 1752 pg/ ml IL-1β nachgewiesen werden.

3.2 Ergebnisse der Lagerfähigkeit von Blutproben

Für die Testdurchführung wird vorgeschlagen, die Blutproben bis spätestens 4 Stunden nach Abnahme im Testsystem einzusetzen, was auf Probleme stoßen kann. Daher wurde der Frage nachgegangen, wie

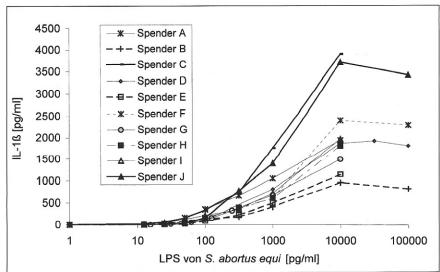


Abbildung 1: Zusammenstellung der LPS-induzierten IL-1β-Auschüttung verschiedener Blutspender.

Das dem Spender entnommene Blut wurde jeweils in einem eigenen Versuch (1000ml 0,9% NaCl, 100µl LPS-Lösung, 100µl Blut) eingesetzt. Als LPS-Konzentration ist die Konzentration der zugegebenen externen Lösung angegeben (maximal 10.000pg/ml oder 100.000pg/ml LPS).



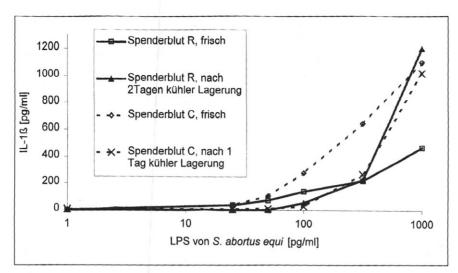


Abbildung 2: Einfluß von 1 bzw. 2 Tagen kühler Lagerung auf Blut am Beispiel zweier Spender.

Das Blut wurde unmittelbar nach Abnahme und nach 1 oder 2 Tagen kühler Lagerung mit LPS (angegeben ist die Konzentration der externen Lösung) inkubiert.

sich eine etwaige Lagerung auf die IL-1β-Ausschüttung auswirkt. Abbildung 2 zeigt die IL-1\beta-Freisetzung nach 24 bzw. 48stündiger Lagerung des Blutes. Im Vergleich mit der Verwendung als Frischblut ist nach 24 Stunden Lagerung im Kühlschrank eine höhere LPS-Konzentration erforderlich, um eine IL-1β-Freisetzung zu erreichen. Bei hohen LPS-Konzentrationen wird allerdings die gleiche absolute Freisetzungsmenge erreicht. Ausgeprägter wird das Bild nach 48stündiger Lagerung. Die erforderliche LPS-Konzentration ist deutlich rechtsverschoben, die IL-1\beta-Ausschüttung steigt dann rasch an und ist bei hohen LPS-Konzentrationen deutlich höher als bei sofortigem Einsatz des Blutes.

3.3 Ergebnisse bei Überprüfung von Infusionslösungen

3.3.1 Feststellung der Endotoxinnachweisgrenzen

Bei sechs Infusionslösungen wurde untersucht, inwieweit die im LAL-Test einzuhaltenden Endotoxingrenzwerte, die in den Monographien vorgeschrieben bzw. nach dem Euopäischen Arzneibuch berechnet werden müssen, erreicht werden können. Die Blutsensitivität, d.h. die erreichbare Nachweisgrenze von LPS, schwankte bei den überprüften Infusionslösungen zwischen 30 und 100 pg/ml LPS und lag damit im Bereich der vorgeschriebenen Werte bei fünf von sechs Infusionslösungen. In einer der sechs Lösungen,

nämlich Longasteril® 40 kochsalzhaltig (Plasmaexpander mit Dextran) dürfen, da es in großem Volumen und schnell infundiert werden kann, höchstens 25 pg/ml LPS enthalten sein. Durch Änderung des Testschemas, d.h. Einsatz der dreifachen Menge (300 μl Proben- bzw. LPS-Lösung bei entsprechend weniger 0,9%iger NaCl-Lösung), konnte ein Gehalt unter 11 pg/ml LPS-Äquivalent ermittelt werden.

3.3.2 Untersuchungen zur Interferenz

Eine Interferenz zwischen Probe und Testsystem trat lediglich bei der Überprüfung des Aminosäuregemischs Thomaemin® hepar auf. Durch eine 1:4 Verdünnung der Probe konnte diese beseitigt werden. In dieser Verdünnung konnte gezeigt werden, daß die Probe weniger als 200 pg/ml LPS-Äquivalente enthielt, der Grenzwert von 400 pg/ml wurde damit unterschritten.

3.3.3 Ergebnisse der Wiederfindungsversuche

Nachfolgend aufgeführte Infusionslösungen wurden mit LPS gespeikt, um die Wiederfindungsrate zu überprüfen. Die Ergebnisse der nachgewiesenen LPS-Wiederfindung sind in Klammern aufgeführt:

– Wässrige Glukose 2,5%/NaCl 0,45%-Lösung (Speik 62,5 pg/ml LPS, Wiederfindung 62,5 - 125 pg/ml)

- Longasteril[®] 40 (Speik 25 pg/ml LPS, Wiederfindung > 10,8 pg/ml)
- Ringer-Lösung Rentschler (Speik 100pg/ml LPS, Wiederfindung 87-174 pg/ml)

- Gelafundin" (Speik 66 pg/ml LPS, Wiederfindung > 57,4 pg/ml)

Aus versuchstechnischen Gründen konnte bei Longasteril" 40 und Gelafundin"keine weitergehende Verdünnung des LPS vorgenommen werden, so daß kein Intervall für die Wiederfindung angegeben werden kann. Entscheidend ist aber, daß alle Dotierungen, die sehr gering (im Bereich der Endotoxingrenzwerte) waren, erkannt wurden und in einem Routinetest aufgefallen wären.

4 Diskussion

Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war es, die von Hartung und Wendel (1995) beschriebene Methode zur Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell bezüglich der verschiedensten Ablaufschritte unter Praxisbedingungen zu validieren und ihren Einsatz für den Pyrogennachweis in pharmazeutischen Lösungen zu überprüfen.

In unserem Untersuchungsablauf konnte bestätigt werden, daß die Freisetzung von IL-1β im Testsystem ohne Vorhandensein von Endotoxin nicht stattfindet, so daß eine ausgesprochen hohe Spezifität für den Nachweis von Pyrogenen postuliert werden kann. Mit dem Einsatz von verschiedenen Vollblutspendern konnte zudem dargestellt werden, daß unabhängig vom individuellen Ausgangsmaterial eine hohe Sensitivität für den Pyrogennachweis besteht, d.h. daß bereits durch die außerordentlich geringe Konzentration von 2-5 pg/ ml LPS eine Ausschüttung von IL-1β in validierbaren Konzentrationen stattfindet, so daß neben der hohen Spezifität dieses Testsystem auch eine hohe Sensitivität aufweist. Diese Sensitivität wird reduziert, wenn statt des Einsatzes von Frischblut die Lagerungszeit der Blutproben vor ihrem Einsatz im Testsystem unter Kühlschranktemperatur auf 48 Stunden verlängert wird.

Trotz der deutlich nachweisbaren Korrelation zwischen LPS-Konzentration und Ausschüttung von IL-1 β scheint zumindest aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse eine quantitative Bewertung einer Pyrogenbelastung von pharmazeutischen Produkten mit diesem Testsystem nicht möglich, da die absolute Menge an ausgeschüttetem IL-1 β außerordentlich schwankt.

Bezüglich der semiquantitativen Bewertung dieses Testsystems wird von uns die



Anlehnung an die semiquantitative Festgelmethode, die das Europäische Arzneibuch-Supplement 1998 für den LAL-Test beschreibt, empfohlen. Die Gelbildung des Lysats kann hier mit der Überschreitung eines bestimmten Wertes der optischen Dichte im ELISA und die Lysatempfindlichkeit mit der Blutsensitivität gleichgesetzt werden. Gegenüber einer genau festgelegten Lysatempfindlichkeit muß im Vollblutsystem allerdings die Blutsensitivität vor dem Versuch anhand von Erfahrungswerten eingegrenzt werden. Mit dieser Anlehnung an die semiquantitative Festgelmethode, d. h. an ein bereits etabliertes System, sollten Probleme bei der weiteren Validierung des Vollbluttestes leichter bewältigt werden können.

In orientierenden Untersuchungen mit Infusionslösungen konnte bei der Verwendung der Vollbluttestmethode überzeugend dargestellt werden, daß sich auch unter Praxisbedingungen diese neue Methode ausgesprochen gut zum Nachweis von Pyrogenen in solchen pharmazeutischen Produkten eignet. Es wird in weiteren Untersuchungen nachzuweisen sein, inwieweit sich die Methode auch bei der

Verwendung zum Pyrogennachweis in Produkten, bei denen der LAL-Test nicht einsetzbar ist (z.B. zuckerhaltige bzw. eiweißhaltige Lösungen) bewährt und inwieweit nicht nur Endotoxine, sondern Pyrogene insgesamt mit diesem Vollbluttestsystem nachgewiesen werden können.

Literatur

Dinarello, C. A., O'Connor, J. V., Lopreste, G. and Swift, R. L. (1984). Human leukocytic pyrogen test for detection of pyrogenic material in growth hormone produced by recombinant Escherichia coli. J. Clin. Microbiol., Sept. 1984, 323-329.

Europäische Arzneibuch-Kommission (1998). Europäisches Arzneibuch 1997 mit Supplement 1998. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag. Eschborn: GOVI-Verlag.

Hartung, T. und Wendel, A. (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. ALTEX 12, 70-75.

Krüger, D. (1981). Der Pyrogennachweis mittels des Limulustests - Methoden,

Ergebnisse, Möglichkeiten und Grenzen eines In-vitro-Tests. *Pharm. Ind. 43*. Poole, S., Thorpe, R., Meager, A., Hubbard, A. and Gearing, A. J. H. (1988). Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet i: 130*.

Danksagung

Wir danken Dr. Dr. T. Hartung und G. Pinsky für die hervorragende Einarbeitung und fruchtbare andauernde Zusammenarbeit, Prof. Dr. D. Krüger / Roche-Boehringer Mannheim für die Finanzierung der Arbeit und wertvolle Ratschläge und DPC Biermann GmbH / Bad Nauheim für Entwicklung und Bereitstellung des Milenia®Pyrocheck Testsystems.

Korrespondenzadresse

Markus Weigandt Hygiene-Institut der Universität Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 324 D-69120 Heidelberg

Tel.: +49-6221-567804 Fax: +49-6221-565627

E-mail: markus.weigandt@urz.uni-

heidelberg.de



Entwicklung eines Pyrogentests mit Kaninchenblut

Thomas Hartung, Reto Crameri¹ und Albrecht Wendel

Universität Konstanz, Biochemische Pharmakologie, D- Konstanz, Schweizer Institut für Allergie und Asthmaforschung, CH-Davos

Zusammenfassung

Seit den Vierziger Jahren erfolgt die Pyrogentestung, d.h. der Ausschluß von fiebererzeugenden Verunreinigungen in Medikamenten, standardisiert im Tierersuch am Kaninchen. Wir haben kürzlich eine Alternativmethode vorgeschlagen, bei der die zu prüfenden Substanzen mit Blut eines gesunden Spenders inkubiert werden und die Bildung endogener Pyrogene (Interleukin-1, IL-1) als Ausdruck der primären Fieberreaktion des Menschen gemessen wird. Damit erlaubt der Test unmittelbar die Prüfung in der relevanten Spezies. Für verschiedene bakterielle Pyrogene sind jedoch sehr unterschiedliche Potenzen in verschiedenen Spezies bekannt (z.B. bis zu Faktor 10.000 für ein einzelnes Endotoxin in veschiedenen Säugern). Im Rahmen der Validierung der Methode kann im Fall von Diskrepanzen zwischen humanem Blutmodell und Tierversuch nun nicht unterschieden werden, ob es sich um ein in vitro Artefakt oder um einen Speziesunterschied handelt.

Ziel dieses Projektes ist deshalb die Entwicklung eines Bluttests mit Kaninchenblut, um diese Frage im Einzelfall klären zu können. Es wurde dazu Kaninchen-IL-1 exprimiert. Derzeit finden Immunisierungen in Huhn und Maus statt, und es werden möglicherweise kreuzreagierende anti-human-IL-1-Antikörper getestet Damit soll ein ELISA für das Kaninchen-Zytokin aufgebaut werden. Mit Hilfe eines zeitweise kommerziell verfügbaren Kaninchen-TNF-ELISA konnte bereits die prinzipielle Machbarkeit des Testsystems gezeigt werden, d.h. Pyrogene induzierten im Kaninchenblut die Bildung von TNF. Im Human-Modell verhalten sich die Meßparameter IL-1 und TNF sehr ähnlich. Es zeichnet sich eine weitgehend ähnliche Sensitivität von Mensch- und Kaninchenblut ab, wobei einzelne Pyrogene (bisher wurden nur verschiedene Endotoxine getestet) durchaus erhebliche Abweichungen zeigen. Diese Ergebnisse bedürfen allerdings noch der Überprüfung im endgültigen Test. Der demnächst in Aussicht stehende Kaninchen-Test soll unmittelbar in die laufenden Evaluierungen am Paul-Ehrlich-Institut (BMBF) und am Hygieneinstitut Heidelberg (Europäische Pharmakopöe) eingebracht werden. Ein solcher Test stellt jedoch möglicherweise auch einen Prototyp für Tests im veterinärmedizinischen Bereich unter Verwendung der richtigen Zielspezies dar.

Das Projekt wurde gefördert durch die Stiftung Forschung 3R, CH-Münsingen