

J. Bonenberger¹ · W. Diekmann² · S. Fennrich³ · M. Fischer⁴ · A. Friedrich⁵ · M. Hansper⁶ · T. Hartung³ · M. Jahnke⁷ · J. Löwer⁴ · T. Montag⁴ · E. Petri⁸ · H-G. Sonntag⁹ · M. Weigand⁹ · A. Wendel³ · B. Zucker¹⁰

¹Sensotest GbR, Ulm, und Phytos GbR, Neu-Ulm · ²BMBF Bonn · ³Universität Konstanz

⁴Paul-Ehrlich-Institut, Langen · ⁵Bioservices, Planegg · ⁶BEO Jülich · ⁷Pharma Hameln GmbH, Hameln

⁸Greiner, Frickenhausen · ⁹Universität Heidelberg · ¹⁰Freie Universität Berlin

Pyrogentestung mit Vollblut

Zusammenfassung eines Status-Workshops am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, am 22.11.1999

Zu Beginn des Jahrhunderts wurde durch die von Paul Ehrlich entwickelte Salvarsan-Therapie der Syphilis die parenterale Gabe von Medikamenten ärztliche Routine. Spätestens seitdem wissen wir um den Segen, aber auch um die Gefahren dieses Applikationsweges. Infektionen und Fieberreaktion erwiesen sich als bis heute gefürchtete Komplikationen. Während der Infektion durch aseptische Herstellung und Sterilitätsprüfung relativ schnell vorgebeugt werden konnte, beschäftigte die Vermeidung der pyrogenen, also fiebererzeugenden Nebenwirkungen seit Beginn des vergangenen Jahrhunderts sowohl Wissenschaftler und Hersteller von Parenteralia als auch den Gesetzgeber.

Meilensteine waren die Einführung des Kaninchen-Pyrogentestes in den vierziger und die des Amöbozyten-Lysat-Testes in den siebziger Jahren. Damit wurde es möglich, einen hohen Standard in der Pyrogenfreiheit von Arzneimitteln zu erreichen. Der Pyrogentest am Kaninchen weist den Vorteil auf, die gesamte Palette der bekannten und noch unbekannt Pyrogene – ob bakterieller, viraler, parasitärer oder chemisch/biochemischer Natur – nachweisen zu können. Er ist bis heute für die Arzneimittelprüfung vieler Präparate, insbesondere von Biologika wie Gerinnungsfaktorenkonzentrate, Immunglobuline oder Albumin unverzichtbar. Andererseits werden Tierversuche mehr und mehr einer kritischen Überprüfung unterzogen. Als Einschränkung seiner Aus-

sagekraft ist zu nennen, dass offenbar nicht alle für den Menschen pyrogen wirksamen Substanzen auch im Kaninchen Fieber erzeugen, da immer wieder Diskrepanzen zwischen erfolgreicher Testung und Fieberepisoden in der Klinik auftreten. Der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test ist sensitiver und besser standardisierbar als der Kaninchentest und erlaubt außerdem eine quantitative Aussage. Ein wesentlicher Nachteil besteht darin, dass damit ausschließlich Lipopolysaccharide, die Endotoxine der gramnegativen Bakterien, nachgewiesen werden können. Auch hier wird von negativen Testergebnissen einerseits und pyrogenen Reaktionen beim Patienten andererseits berichtet. Außerdem stellt die Gewinnung des Lysats aus dem als gefährdete Spezies eingeordneten Pfeilschwanzkrebs (*Limulus polyphemus*) ebenfalls einen Tierversuch dar, wenn auch strikte Vorschriften für die Blutentnahme bestehen.

Es war naheliegend, mit der Entdeckung der wesentlichen Komponenten der Fieberreaktion des Menschen über neue zelluläre Testsysteme nachzudenken, welche die natürliche Fieberreaktion zu ihrer Grundlage haben. So führte die um 1980 erfolgte Entdeckung von Interleukin-1 durch Charles Dinarello und Mitarbeiter bereits 1982 zum Vorschlag eines Pyrogentestes auf der Basis von menschlichen Leukozyten. Die Idee dieser Gruppe wurde vielfältig aufgegriffen und variiert, jedoch haben sich die Testsysteme unter Verwendung von aufge-

reinigten menschlichen Blutzellen oder auch Zelllinien bisher in der Praxis nicht bewährt, da sie aufwendig und wenig standardisierbar sind.

“Nach der Entdeckung der wesentlichen Komponenten der Fieberreaktion des Menschen wurde über neue zelluläre Testsysteme zur Pyrogentestung nachgedacht.”

Der Langener Statusworkshop widmete sich einem Ansatz, der dieses Problem vielleicht für die Routine lösen kann. Der erstmals 1995 gemachte Vorschlag, Vollblut gesunder Spender als zelluläres Nachweissystem zu verwenden, hat die Praktikabilität solcher alternativer Prüfungen auf Pyrogene wesentlich verbessert. Die bunte Palette mittlerweile erfolgreich erprobter und auch neuer Anwendungen des Vollblutpyrogentestes wurde vorgestellt, diskutiert und der Stand der jeweiligen Entwicklung festgehalten. Es entstand die berechtigte Hoffnung, dass der neue Test die für die Arzneimittelprüfung erforderlichen Kriterien erfüllt und die Ablösung des Tierversuchs Pyrogentest am Kaninchen greifbar nahe liegt. Die durch das Bundesministerium für Bildung und

Dr. Thomas Montag-Lessing
Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Str. 51-59, 63225 Langen

Forschung geförderte Kooperation zwischen der Universität Konstanz und dem Paul-Ehrlich-Institut stellt sicher den Motor dieser Entwicklungen dar. Darüber hinaus ist in wenigen Jahren ein großer Verbund von Kooperationspartnern aus wissenschaftlichen Einrichtungen und der Industrie entstanden, in welchem der neue Pyrogentest angewandt und weiterentwickelt wird und sich auch völlig neue Anwendungen aufbauen.

T. Hartung, J. Löwer, T. Montag, A. Wendel

“Ersatzmethoden zum Tierversuch” – ein langjähriger Förderschwerpunkt des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF)

Das BMBF fördert seit 1980 Forschungsvorhaben, deren zentrale Zielsetzung darin besteht, Tierversuche zu ersetzen und somit einen Beitrag zur Reduktion des Versuchstierverbrauchs in Deutschland zu leisten. Mit der “Bekanntmachung über die Förderung von “Projektarbeiten Ersatzmethoden zum Tierversuch” wurde 1984 ein eigener Förderschwerpunkt im Rahmen des Biotechnologie-Förderprogramms eingerichtet. Im Mai 1989 folgte eine zweite Bekanntmachung. Auch sie ist inzwischen durch die aktuell gültige Fassung, die im Bundesanzeiger vom 30. Juni 1998 veröffentlicht wurde, abgelöst worden.

Der Förderschwerpunkt wird im Sinne des sog. 3R-Konzeptes umgesetzt, welches den Ersatz (Replacement), die Verbesserung hinsichtlich des Belastungsdrucks (Refinement) und die Verringerung der Tierzahlen (Reduction) von Tierversuchen einschließt. Stark belastende oder zahlenmäßig sehr umfangreiche Tierversuche stehen dabei im Vordergrund.

“Bei der Suche nach Ersatzmethoden zum Tierversuch liegt ein besonderer Schwerpunkt bei der Entwicklung und Validierung von Alternativen für gesetzlich vorgeschriebene Tierversuche.”

Ein besonderer Schwerpunkt liegt derzeit auf der Entwicklung und insbesondere auf der Validierung von Alternativen

für gesetzlich vorgeschriebene Tierversuche. In den betroffenen Rechtsbereichen wie z.B. dem Arzneimittel-, dem Chemikalien- oder dem Abwasserabgabegesetz ist eine breite Anwendung von Alternativmethoden jedoch nur möglich, wenn es zu einer Änderung oder Ergänzung der betreffenden gesetzlichen Regelungen kommt. Dementsprechend werden die zuständigen nationalen und internationalen Behörden in angemessener Form in die Planung und Durchführung der Forschungsprojekte stets miteinbezogen.

Die Vorhaben werden weiterhin möglichst unter Beteiligung der Anwender, also zusammen mit Industrieunternehmen durchgeführt; und zwar i.d.R. als Verbundprojekte in Kooperation zwischen mehreren Industrieunternehmen oder Industrieunternehmen und wissenschaftlichen Einrichtungen. Dadurch sollen die Aussichten auf einen späteren praktischen Einsatz der zu erarbeitenden Methoden verbessert werden.

Der BMBF-Schwerpunkt stellt weltweit die größtenordnungsmäßig bedeutendste und längste Förderaktivität zur Thematik dar. So wurden in fast 20 Jahren bislang ca. 140 Millionen DM, also im Schnitt etwa 7 Mio. DM jährlich, in Form von Projektfördermitteln eingesetzt. Das BMBF hält nach wie vor an den allgemeinen Zielsetzungen des Förderschwerpunktes fest und wird auch in Zukunft Mittel in ähnlicher Größenordnung wie bisher bereitstellen.

Angesichts der hohen Anzahl von über 200 geförderten Projekten stellt sich jedoch die kritische Frage, ob mit dem erbrachten Aufwand auch eine maximale Reduktion des Tierverbrauchs erreicht wurde oder ob noch Potentiale zur Steigerung der Effizienz der Förderung bestehen. Um die Zielorientierung des Förderschwerpunktes weiter zu schärfen, wird das BMBF eine neue Konzeption erarbeiten, welche 2000 in Form einer neuen Ausschreibung bekannt gemacht wird. Grundsätzliche Veränderungen sind hierbei sicherlich nicht zu erwarten; bislang ist jedoch noch ungewiss, welchen Stellenwert die Förderung von Validierungsstudien in Zukunft einnehmen kann und sollte. Als wesentliches Novum für künftige Antragsteller ist die erforderliche Berücksichtigung neuer Förderrichtlinien zu nennen. Sie werden den Projektarbeitern zwar exklusive Verwertungsrechte ein-

räumen, ihnen dafür aber auch eine Verwertungspflicht auferlegen.

Mit der Umsetzung des Förderprogrammes von der Förderberatung über die Vorbereitung der Förderentscheidungen bis hin zur Begleitung der einzelnen Fördervorhaben bis zum Ende ihrer Laufzeit ist der Projektträger Biologie, Energie, Umwelt (kurz: “BEO”) am Forschungszentrum Jülich beliehen.

W. Diekmann, BMBF Bonn

Ausgewählte Ergebnisse zum Förderschwerpunkt “Ersatzmethoden zum Tierversuch” im Rahmen des Programms “Biotechnologie 2000” der Bundesregierung

Die ATC-Methode

Projekte 0318956A “Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien” und 0318956B “Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien”:

- ▶ Ausarbeitung von Kriterien zur Vermeidung der präfinalen Belastung der Versuchstiere,
- ▶ Ausarbeitung von Prüfrichtlinien zur akuten inhalativen und dermalen Toxizität.

In einem vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin koordinierten Ringversuch konnte die im BgVV entwickelte sogenannte Acute-Toxic-Class (ATC)-Methode zur Bestimmung der akuten oralen Toxizität von Chemikalien als Ersatz des LD50-Tests erfolgreich validiert werden. Mit der ATC-Methode wird die Zahl der Versuchstiere im Vergleich zum LD50-Test um ca. 70% verringert. Die neue Prüfmethode wurde 1996 von der OECD und der EU offiziell anerkannt. Sie liegt als OECD-Guideline vor und kann weltweit eingesetzt werden.

In einem Anschlussprojekt wurden ebenfalls beim BgVV weitergehende Arbeiten zur Ausarbeitung entsprechender Prüfrichtlinien zur akuten inhalativen und dermalen Toxizität durchgeführt. Aufgrund der Resultate bestehen gute Aussichten, in absehbarer Zeit zu einer Anerkennung dieser weiteren Prüfrichtlinie auf OECD-Ebene zu kommen.

Anomale Toxizität

Projekt 0310624 "Untersuchung zur Aussagekraft der Arzneibuchvorschrift V.2.1.5 über die Prüfung auf anomale Toxizität von Impfstoffen"

Am Paul-Ehrlich-Institut wurde in den Jahren 1993 bis 1995 das o. g. Forschungsvorhaben durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Vorhabens führten dazu, dass die Europäische Arzneibuchkommission auf ihrer Sitzung im November 1995 beschloss, den Test auf anomale Toxizität (ATT) als Routineprüfung abzuschaffen. Mit den zum 1.1.1997 in Kraft getretenen Regelungen werden allein in Deutschland bei Herstellern und Kontrollbehörden pro Jahr etwa 20 000 Meerschweinchen und Mäuse eingespart. Die im Paul-Ehrlich-Institut an diesem Projekt beteiligten Forscher wurden für diese Entwicklung im Jahre 1996 mit dem Tierschutz-Forschungspreis der "Internationalen Stiftung für Alternativ-Methoden zum Tierversuch" (F.I.S.E.A.) ausgezeichnet.

Monoklonale AK

Projekt 0310081A/B "Entwicklung eines preiswerten und wiederverwendbaren Produktionsgefäßes für ein neuartiges In-vitro-Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper als Ersatz zur Ascites-Produktion in lebenden Mäusen"

Der Heraeus Instruments GmbH (Zweigniederlassung Osterode) ist es in enger Zusammenarbeit mit weiteren Partnern gelungen, die In-vivo-Produktion monoklonaler Antikörper in Mäusen vollständig durch eine In-vitro-Produktion in einem Bioreaktor zu ersetzen. Dieser Bioreaktor, auch "Glasmaus" genannt, ersetzt bereits seit mehreren Jahren die lebende Maus als Medium für die Produktion der o.g. Antikörper. Das Gerät ist kommerziell erhältlich. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die In-vivo-Produktion monoklonaler Antikörper nur in wenigen Ausnahmefällen als unerlässlich zu betrachten ist (s. S. 62 Tierschutzbericht): Gewinnung monoklonaler Antikörper für die Diagnostik oder Therapie beim Menschen in Notfällen; "Rettung" von Hybridomen, wenn diese in der Zellkultur nicht mehr wachsen oder wenn sie infiziert

sind sowie Erarbeitung neuer Fragestellungen.

Myograph

Projekt 0310535A "Technologie-Entwicklung für einen physiologischen Unterricht ohne die Notwendigkeit von Froschversuchen"

Innerhalb des Projektes der Fa. Wolfgang Kuck Medizin-Elektronik wurde ein Myographensystem (Myograph) entwickelt, das die "klassischen Froschversuche" im Physiologiepraktikum ersetzt: Das Gerät ermöglicht es dem Studenten, dass dieser ohne Schmerzen, ohne Schädigung und ohne invasiven Eingriff im Selbstversuch alle Experimente im Bereich Nerv/Muskel durchführen kann. Die verwendete elektronische Messtechnik ist besser in der Lage, unverfälschte Kontraktionsabläufe aufzuzeichnen als die Systeme, die früher für Untersuchungen an Froschmuskeln verwendet wurden. Die mit dem Myograph erzielten Messergebnisse sind nicht nur ein Ersatz für Versuche mit isolierten Froschmuskeln. Sie sind viel umfangreicher und dienen zur Vertiefung des Lehrstoffes. Das Myographensystem ist ebenfalls kommerziell erhältlich. Die Projektleiter der beteiligten Arbeitsgruppen der Firma Kuck Medizin-Elektronik GmbH und der Universität Frankfurt wurden für diese Entwicklung im Dezember 1997 mit dem Felix-Wankel-Tierschutz-Forschungspreis ausgezeichnet.

Ausblick

Auf Resultate aus zur Zeit laufenden Forschungsprojekten wurde nicht eingegangen, da es im Bereich der gesetzlich geforderten Tierversuche kaum möglich ist, eine Prognose abzugeben, ob und inwieweit und ggf. zu welchem Zeitpunkt mit einer offiziellen Anerkennung einer Neuentwicklung zu rechnen ist. Im Rahmen aktuell geförderter bzw. kürzlich beendeter Projekte konnten aber bereits vielversprechende Resultate erzielt werden, die Anlass zu der berechtigten Hoffnung geben, in absehbarer Zeit weitere und wesentliche Erfolge im Sinne der "3 R" verzeichnen zu können: Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien die Themen "In-vitro-Mikrokerntest", "Die Nutzung hepatischer Funktionen für In-

Vitro-Verfahren zur Prüfung von Stoffen", "Eignung möglicher Ersatzmethoden zum Fremdvirusausschluss bei Veterinärimpfstoffen", "Serologische Methoden bei der Wirksamkeitsprüfung von Rotlaufimpfstoffen", "In-vitro-Pulpakammer-System zur Toxizitätsprüfung zahnärztlicher Füllungwerkstoffe" und "Evaluierung und Prävalidierung eines Vollblutmodelles zum Ersatz des Pyrogentests am Kaninchen" genannt.

Die zentrale Zielsetzung dieses Förderschwerpunktes besteht nach wie vor darin, Forschungsvorhaben zu fördern, die einen möglichst effektiven Beitrag zum Ersatz von Tierversuchen leisten.

Ergänzende Informationen:

Tierschutzbericht 1999

Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes. Deutscher Bundestag, 14. Wahlperiode, Drucksache 14/600

Bekanntmachung der Förderrichtlinien "Ersatzmethoden zum Tierversuch" im Programm der Bundesregierung "Biotechnologie 2000" vom 17. Juni 1998. Bundesanzeiger Nr. 117, S. 9051

Projektliste BMBF-Förderschwerpunkt "Ersatzmethoden zum Tierversuch"

M. Hansper, BEO Jülich

Detektion von Pyrogenen mit humanem Vollblut

Obwohl bereits wenige Bakterien in einzelnen Kompartimenten des Körpers eine bedrohliche Infektion initiieren können, beherbergt der menschliche Körper insgesamt zehn mal mehr Bakterien als körpereigene Zellen. Allein im Darm sind dies etwa ein Kilogramm Gram-negativer Bakterien. Für die Vermeidung von Infektionen ist es für den Körper deshalb unerlässlich, Infektionen früh zu bemerken und durch Entzündung und Fieber unmittelbar zu bekämpfen. Die Strukturen der Bakterien, die er als Erkennungszeichen verwendet, sind die Pyrogene, deren bekannteste Vertreter die Endotoxine Gram-negativer Bakterien sind. Etwa fünfzig Gramm solcher Endotoxine befinden sich in den Darmbakterien eines Menschen – genug, um theoretisch bei intravenöser Gabe eine Million Menschen im pyrogenen Schock umzubringen oder in einer Milliarde Menschen Fieber auszulösen. Dieses anschauliche Beispiel zeigt einerseits, wie empfindlich der Organismus auf Pyro-

gene reagiert, und andererseits, wie wichtig die Pyrogen-Freiheit injizierbarer Medikamente ist.

“Bereits 1982 zeigten Kirchner und Mitarbeiter, dass menschliches Blut ein sehr bequemes handhabbares Zellsystem zum Studium der Bildung von Entzündungsmediatoren darstellt.”

Trotz zunehmender Anwendung in der biomedizinischen Forschung dauerte es bis 1995, dass erstmals der Nutzen für die Pyrogentestung gezeigt wurde. Das Prinzip ist auch nach mehreren Jahren der Feinarbeit immer noch denkbar einfach: verdünntes Blut wird mit der Probe zusammengebracht, bei 37°C inkubiert und dann die Freisetzung von Fieberbotenstoffen im ELISA gemessen. Durch die Förderung durch ZEBET (Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) war es möglich, das Modell zu standardisieren und zu vereinfachen: Heparinblut wird innerhalb von acht Stunden nach der Entnahme mit klinischer Salinelösung verdünnt und im einfachsten Fall im Thermoblock in Polypropylen-Röhren inkubiert. Die ELISA-Messung kann zum Beispiel mittels eines in der Zwischenzeit von der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim, standardisiert erhältlichen Kits ermittelt werden, der auch eine Reihe von Kontrollen für die Reaktionsfähigkeit des Spenders enthält.

Mit diesem Test konnte gezeigt werden, dass nicht nur wie im Limulus-Test Gram-negative Endotoxine mit ähnlicher Sensitivität gemessen werden können, sondern dass auch Pyrogene von Gram-positiven Bakterien und Pilzen detektiert werden. Für die Endotoxine zeigte sich interessanterweise, dass die biologische Potenz einzelner Endotoxine von verschiedenen Bakterienstämmen im Limulus-Test und im Vollblutmodell sich wesentlich unterscheiden: So konnte der Limulus-Test nicht zwischen zwei Endotoxinen unterscheiden, die sich in ihrer Potenz im Blut des Menschen bezüglich der Interleukin-1-Induktion um den Faktor 10 000 unterscheiden. Dieser Vergleich umfasst mittlerweile rund 80 Endotoxine und

40 Nicht-Endotoxin-Pyrogene. Danach kann der Limulus-Test eigentlich nur für die Endotoxine von *E. coli* und *Salmonellen* befriedigen, zumal die biologische Potenz im Vollblut und im Kaninchen nach den allerdings noch sehr lückenhaft verfügbaren Daten sehr gut korrelieren.

Erste Anwendungsbeobachtungen werden in verschiedenen Beiträgen dargestellt; es sollen deshalb hier nur einige Besonderheiten des Tests angeführt werden. Erstens wird er naturgemäß nur sehr wenig durch Blutkomponenten gestört, was die Prüfung von diesen sonst besonders problematischen Produkten ermöglicht. Im Extremfall kann sogar Blut verschiedener Spender unabhängig von der Blutgruppe gemischt werden – damit wäre sogar erstmals eine Pyrogentestung von zellulären Blutkomponenten denkbar. Ähnliches gilt für andere zelluläre Therapeutika wie Stammzellen, Lymphokin-aktivierte Killerzellen oder genterapeutische Präparationen. Zweitens erlaubt der Test auch die Prüfung von Feststoffen durch Einlegen oder Durchspülen, während der Limulus-Test auf Eluate dieser Materialien beschränkt bleibt. Die Konsequenzen für die Prüfung von Biomaterialien wie Medical Devices, Dialyse-Geräten oder Filtern in der Kontrolle von Luft und Flüssigkeiten zeichnen sich gerade erst ab (vergl. die Einzelbeiträge). Drittens ist es im Labormaßstab bereits dank eines von der Stiftung set unterstützten Projektes möglich, tiefgefrorenes (kryopräserviertes) Blut für den Test zu verwenden. Das Potential dieser Weiterentwicklung für die Standardisierung und Praktikabilität des Testes kann noch nicht abgeschätzt werden. Viertens ist es durch eine Förderung der Stiftung 3R möglich gewesen, ein analoges Modell auf Basis von Kaninchenblut zu entwickeln; damit sollten bei Diskrepanzen zwischen Kaninchentest und Vollblutmodell In-vitro-Artefakte von Speziesunterschieden unterschieden werden können.

Die Entwicklung, Evaluierung und Validierung der Methode ist beispielhaft stürmisch verlaufen: In fünf Jahren ist ein Netzwerk von etwa 40 Gruppen entstanden, das zum Teil aus Eigeninitiative und zum Teil durch eine großzügige Förderung verschiedener Einrichtungen möglich wurde; erwähnt seien hier neben dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und ZEBET, die

Stiftung 3R, die Stiftung set, ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) und die Europäische Kommission im Rahmen des Fünften Rahmenprogrammes.

T. Hartung, S. Fennrich, A. Wendel,
Universität Konstanz

Pyrogentests in der Arzneimittelsicherheit

Fiebererzeugende Verunreinigungen in Parenteralia, die sogenannten Pyrogene, stellen ein bedeutendes Risiko dar. In Anhängigkeit von der Konzentration können sie zum pyrogenen Schock, ja bis zum Tod des Patienten führen. Die Fieberreaktion ist eng mit Infektionen durch Bakterien, Viren und Parasiten verbunden. Schon Ende des 19. Jahrhunderts hatte sich aber gezeigt, dass Pyrogenität nicht zwingend an die Infektionsfähigkeit gekoppelt ist, sondern auch sterile Lösungen Fieber hervorrufen können.

“Pyrogenität ist nicht zwingend an die Infektionsfähigkeit gekoppelt, auch sterile Lösungen können Fieber hervorrufen.”

Die pyrogenen Substanzen erwiesen sich als unerwartet thermostabil, ihre biologische Aktivität blieb in vielen Fällen auch nach dem Autoklavieren erhalten. In der Folgezeit konnte ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, das Lipopolysaccharid (Endotoxin, LPS) isoliert und als die thermostabile pyrogene Substanz charakterisiert werden. Die Lipopolysaccharide sind heute bestens charakterisiert, was leider für andere Pyrogene nicht gilt. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass eine Vielzahl unbekannter Pyrogene existiert, welche sich nur empirisch über ihre fiebererzeugende Potenz nachweisen lassen.

In den vierziger Jahren des letzten Jahrhunderts nahm die Infusionstherapie deutlich an Bedeutung und Umfang zu, woraus die Notwendigkeit eines Tests auf pyrogene Kontamination erwuchs. So wurde in dieser Zeit der Kaninchenpyrogentest etabliert, der über Jahrzehnte ein hohes Maß an Sicherheit für Parenteralia gewährleistete. Der Kanin-

chenpyrogentest stieß sehr deutlich an seine Grenzen, als in den 70er Jahren vermehrt Radiopharmaka zum Einsatz kamen. Diese Arzneimittel waren im Kaninchen nicht testbar, und eine Alternative wurde erforderlich. Es wurde schließlich der Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (LAL-Test) etabliert, der mit hoher Spezifität ausschließlich das Endotoxin gramnegativer Bakterien erkennt. Damit hat der LAL-Test gegenüber dem Kaninchenpyrogentest einen entscheidenden Nachteil, da das Kaninchen auf alle potentiellen Pyrogene mit Fieber reagiert. Andererseits wurde erstmals eine quantitative Messung von bakteriellem Endotoxin möglich. Weiterhin konnten auch für solche Arzneimittel Endotoxingrenzwerte festgelegt werden, deren pyrogenfreie Herstellung nicht möglich ist (z.B. bestimmte bakterielle Impfstoffe). Außerdem wurde es möglich, Präparate auf eine Endotoxinverunreinigung zu prüfen, welche die Fieberreaktion des Kaninchens unterdrücken (z.B. Antiphlogistika). Dennoch konnte der LAL den Kaninchenpyrogentest, zumindest im Bereich der Europäischen Pharmakopoe, nicht vollständig verdrängen. Für die Mehrzahl der biologischen Arzneimittel ist der Kaninchenpyrogentest nach wie vor unentbehrlich, da viele Präparate dieser Gruppe eine starke Interferenz mit dem LAL-Test zeigen.

“Es existiert eine Vielzahl unbekannter Pyrogene, die sich nur empirisch über ihre fiebererzeugende Potenz nachweisen lassen.”

Der Wunsch nach dem Ersatz von Tierversuchen und die rasante Zunahme der Zahl biologischer Arzneimittel führte zu verschiedenen Ansätzen für die Pyrogentestung in alternativen Systemen, welche zwar aussagekräftig, jedoch wenig praktikabel und kaum standardisierbar waren. Der Vollblutpyrogentest hat diese Nachteile überwunden und wurde von uns auf seine Anwendbarkeit für die Pyrogentestung von biologischen Arzneimitteln geprüft. Die modernen biologischen Arzneimittel sind oft komplexer Natur oder resultieren aus einem komplexen Herstellungsprozeß (rekombinante Proteine, Gentherapeutika mit biologischen Vektoren).

Damit ist für viele dieser Arzneimittel eine Kontamination mit Pyrogenen Nicht-Endotoxincharakters nicht so gut auszuschließen wie für Pharmazeutika, deren Ausgangsstoffe akribisch überprüft werden können. Insbesondere stellen Pilze und sporenbildende, grampositive Bakterien Kontaminanten im biotechnologischen Herstellungsprozess dar. Aber auch die als Vektoren genutzten Viren von Gentherapeutika oder die DNA-Last gentechnisch hergestellter Arzneimittel stellen potentielle Pyrogene dar. Die Arzneimittel mit zellulärer Natur (z.B. Blutkomponenten, Stammzellen) können bis heute nicht auf pyrogene Verunreinigungen getestet werden.

“Ein neuer Assay sollte in der Lage sein, die Vorteile der etablierten Testsysteme zu verbinden und den steigenden Anforderungen der Pyrogentestung gewachsen sein.”

Für eine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse eines Assays sind Kenntnisse über seine Sensitivität und die praktische Relevanz der erhobenen Daten erforderlich. Während für den LAL-Test die Sensitivität mit ca. 3 pg/ml gut definiert ist, gilt für den Kaninchenpyrogentest zunächst das allgemeine Postulat, dass das Kaninchen – bezogen auf das Körpergewicht – eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Endotoxin aufweist wie der Mensch. Dies geht bereits auf Beobachtungen von Westphal von 1956 zurück und konnte in der Folgezeit vielfach experimentell bestätigt werden. Um die Sensitivität von LAL-Test und Kaninchen miteinander vergleichen zu können, führten wir folgende Berechnung durch: In den Kommentaren zum DAB 10 wird die Fieberschwelle für das Kaninchen mit 500 bis 3500 pg/kg Körpermasse angegeben. Diese Menge darf in 10 ml Injektionsvolumen enthalten sein, was einer Konzentration von 50 bis 350 pg/ml entspricht. Der humane Vollblutpyrogentest zeigt ein sicher positives Ergebnis bei einer Endotoxinkonzentration von 20 bis 50 pg/ml. Dieser Wert liegt im Bereich der Fieberschwelle der sensitivsten Kaninchenrassen. Außerdem bildet er auch ziemlich genau die untere Grenze der Fieberreaktion des Menschen ab, was

sich aus folgender Kalkulation ergibt: Das durchschnittliche Blutvolumen eines Erwachsenen beträgt ca. 5 l, seine Fieberschwelle liegt nach den DAB-Kommentaren bei 1000 bis 2000 pg Endotoxin/kg Körpermasse. Dies entspricht, großzügig berechnet, 100 bis 200 ng für den Gesamtorganismus oder 100 bis 200 ng/5 l Blut korrelierend mit 20 bis 40 pg/ml. Die Berechnung auf der Basis des intravasalen Volumens scheint erlaubt, weil solch geringe Mengen Endotoxin vollständig und ohne Verzögerung von der Leber eliminiert werden und somit orientierend die In-vivo-Verhältnisse für pyrogene Reaktionen an der Fieberschwelle berücksichtigt sind.

Neben der Sensitivität ist die Probeninterferenz ein wichtiger Parameter für einen Pyrogentest. Das Kaninchen weist eine hohe Robustheit gegenüber den meisten Proben auf. Probleme entstehen in erster Linie bei antiinflammatorischen Arzneimitteln, die auch antipyretisch wirken. Beim LAL-Test tritt das Problem der Interferenzen dagegen sehr häufig auf, kann aber in vielen Fällen umgangen werden, indem man die Proben verdünnt. Für jedes Arzneimittel ist eine maximal zulässige Verdünnung (MZV) festgelegt. In die Berechnung des MZV fließt sowohl die maximal zulässige Endotoxindosis, als auch die maximale Dosis des zu prüfenden Produktes ein, die pro kg Körpergewicht und Stunde appliziert werden darf.

“Im humanen Vollblutpyrogentest können nach unseren Erfahrungen fast alle biologischen Arzneimittel unverdünnt getestet werden.”

Dennoch sind bei seiner Validierung eine Reihe von denkbaren Interferenzsituationen zwischen Biologika und dem Testsystem zu berücksichtigen:

- ▶ Biologika können die Synthese fiebererzeugender Zytokine stimulieren (z.B. durch Zytokine),
- ▶ Biologika können die Synthese fiebererzeugender Zytokine hemmen (z.B. durch Zytokine; Schädigung oder Hemmung der Makrophagen),
- ▶ Biologika können die Synthese fiebererzeugender Zytokine modulieren (z.B. durch LPS-Adsorption, LPS-Präsentation),

- Biologika können den Zytokin-ELISA beeinflussen (z.B. durch Rheumafaktoren),
- Biologika können selbst fiebererzeugende Zytokine enthalten (z.B. Plasmaprodukte, Zellkulturen).

Im Rahmen der Prävalidierung des Vollblutpyrogenestes wurden die genannten Interferenzprüfungen für die unterschiedlichen Biologika (Plasma, Gerinnungsfaktorenkonzentrate, Albumin, Immunglobuline, Impfstoffe usw.) vorgenommen, um die Basis für entsprechende Prüfverfahren zu erarbeiten. Es ist zu berücksichtigen, dass viele Biologika, insbesondere Gerinnungsfaktorenkonzentrate, von Hersteller zu Hersteller große Unterschiede in ihrer Zusammensetzung aufweisen und deshalb einer individuellen Validierung bedürfen. Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, dass der neue Test für die Prüfung biologischer Arzneimittel auf Pyrogenfreiheit sehr gut geeignet ist.

M. Fischer, T. Montag,

Paul-Ehrlich-Institut, Langen

Untersuchungen zur Eignung des Humanen Vollbluttests als Pyrogenprüfmethode bei Parenteralia

Als Goldstandard zur Pyrogenprüfung von Arzneimitteln dient seit über 50 Jahren der Tierversuch am Kaninchen. Daneben existiert ein quantitatives in-vitro-Verfahren, der LAL-Test, der nur die pyrogenen Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien (Endotoxin) nachweist. Wir verglichen diese beiden Verfahren mit dem oben vorgestellten neuen Vollblutpyrogenest. Bei der Charakterisierung des Vollbluttests mit Blut von 43 verschiedenen Spendern konnten wir folgendes zeigen: unstimuliertes Blut schüttet kein Interleukin-1 β (IL-1 β) aus. Ab einer Minimalkonzentration von 5 bis 50 pg/ml Endotoxin von *E. coli* O55:B5 reagiert der Vollbluttest mit einer konzentrationsabhängigen IL-1 β -Ausschüttung. Die absolute Menge an ausgeschüttetem IL-1 β variiert und hängt unter standardisierten Bedingungen hauptsächlich vom jeweils verwendeten Blutspender ab.

Anhand von 23 Fertigarzneimitteln wurde die Eignung des Vollbluttests als Pyrogenprüfmethode bei Parenteralia untersucht und mit dem LAL- und Ka-

ninchenpyrogenest verglichen. Das Europäische Arzneibuch schreibt bei Prüfungen mit dem LAL-Test Endotoximgrenzwerte für Arzneimittel vor. Der Vollbluttest war bei allen Arzneimitteln sensitiv genug, um diese Endotoximgrenzwerte einzuhalten. 19 Fertigarzneimittel wurden mit Endotoxin versetzt. Diese Proben waren im Vollbluttest auffällig, und es gelang die quantitativ richtige Wiederfindung. Im Gegensatz dazu wurden fünf von 19 endotoxinhaltigen Proben im Kaninchentest nicht erkannt. Von einem Kooperationspartner wurde uns eine Probe eines biotechnologisch hergestellten Fertigarzneimittels überlassen, die in der Klinik pyrogene Nebenwirkungen hervorgerufen hatte, obwohl sie im LAL-Test und Kaninchenpyrogenest unauffällig war. Unsere Prüfung im Vollbluttest ergab allerdings eine deutliche Pyrogenbelastung der Probe.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass 1. aufgrund der bisherigen Untersuchungen der Vollbluttest die Anforderungen an eine moderne Pyrogenprüfmethode erfüllt und 2. der Kaninchentest als bisheriger Goldstandard der Pyrogenprüfung eine Sicherheitslücke aufweist.

M. Weigandt, H.-G. Sonntag,
Universität Heidelberg

Prüfung von Parenteralia im humanen Vollblut – Pyrogenest PyroCheck[®]

Injizierbare Arzneimittel (Parenteralia) müssen nachweislich frei von fieberinduzierenden Verunreinigungen chemischer oder biologischer Herkunft sein. Zur Überprüfung der Produktqualität werden in den aktuellen Versionen der europäischen (EP) sowie amerikanischen Pharmakopöe (USP) der Limulus Amoebocyten Lysat (LAL)-Test und der Pyrogenest am Kaninchen beschrieben. Mit dem Testsystem PyroCheck[®] steht nunmehr ein Routinetest zur Prüfung auf fieberinduzierende Substanzen in humanem Vollblut zur Verfügung, der im Rahmen von Evaluierungsstudien an vielfältigen Produkten eingesetzt wurde. Der humane Vollbluttest PyroCheck[®] wurde vergleichend zum LAL- und In-vivo-Pyrogenest zur Prüfung parenteraler Arzneimittel eingesetzt.

Die Untersuchung einer Arzneimittelprobe wird inklusive eines Interferenztests in frisch entnommenem Vollblut nach den Angaben des PyroCheck[®]-

Testsystems durchgeführt. Parenterale Arzneimittel verschiedener Herstellungsladungen wurden in möglichst allen drei genannten Testmethoden zur Qualitätskontrolle auf fieberinduzierende Substanzen untersucht. Dazu werden Prüfmuster jeweils vom Beginn, der Mitte und dem Ende der Arzneimittelabfüllung gewonnen.

In Summe wurden 96 Chargen parenteraler Arzneimittel aus 21 Arzneimittelkategorien überprüft. Daten aus dem In-vivo-Pyrogenest, dem LAL-Test sowie dem PyroCheck[®]-Vollbluttest wurden direkt verglichen. Stoffwechselfeinflussende Arzneimittel oder Suspensionen sowie Betäubungsmittel ließen sich nicht im In-vivo-Pyrogenest überprüfen. Auch im LAL-Test konnten wegen störender Einflüsse verschiedene Chargen wegen extremer pH-Werte oder Suspensionen nicht geprüft werden. Im Vollbluttest PyroCheck[®] waren hingegen alle eingesetzten Arzneimittel, teilweise nach einem Ausschluss von Interferenzen (Verdünnung), prüfbar. Im Fall dopaminhaltiger Arzneimittel war eine stärkere Verdünnung als die auf der Basis des LAL-Tests zulässige maximale Verdünnungskonzentration (MZV) nötig. In einem Fall wurde eine pyrogenhaltige Charge sicher in allen drei Prüfsystemen erkannt.

Das PyroCheck[®]-Testsystem stellt ein homologes Prüfsystem dar. Endotoxine chemischen, gramnegativen und grampositiven bakteriellen Ursprungs werden im humanen Vollblut nachgewiesen. Das Testsystem zeichnet sich durch eine vergleichbar einfache methodische Durchführbarkeit aus. Spezielle Zellkulturtechniken und Inkubatoren sind nicht notwendig. Die Resultate im Rahmen der Prüfung parenteraler Arzneimittel auf potentiell fieberinduzierende Substanzen waren vergleichbar mit den üblichen, pharmakopöalen Testmethoden.

M. Jahnke, Pharma Hameln GmbH,
Hameln

Erste Erfahrungen mit PyroCheck beim Test von injizierbaren Arzneimitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs

Im Rahmen der Validierung von PyroCheck wurden von Phytos, Labor für Analytik von Naturheilmitteln GbR und Sensotest, Biologische Testsysteme GbR,

22 Arzneimittel auf das Vorhandensein pygener Verunreinigungen getestet. Bei den ausgesuchten Arzneimitteln handelt es sich um Injektionslösungen pflanzlichen und tierischen Ursprungs, die von Phytos routinemäßig mit dem LAL-Test untersucht werden. Die Vollblutstimulation und Durchführung des ELISAs erfolgte nach Testvorschrift. Eine Interferenztestung wurde für zwei Arzneimittel, die im LAL-Test verstärkende Wirkung zeigen, durchgeführt. Im ELISA führten diese Präparate zu einem negativen Ergebnis und Interferenz mit dem verwendeten Vollblut. Von den restlichen 20 getesteten Arzneimitteln zeigten drei Präparate ein positives Ergebnis im ELISA. Diese drei Proben wurden weiter untersucht und einer Interferenztestung unterzogen. Zwei dieser Proben zeigten Interferenz mit dem Vollblut, aber abschwächende Wirkung im ELISA. Eines der Präparate jedoch führte im ELISA zu einem positiven Nachweis von IL-1 β , ohne mit dem Vollblut zu interferieren.

J. Bonenberger, J. Bohnacker, A. Hofmann, Sensotest GbR, Ulm und Phytos GbR, Neu-Ulm

Dialyseflüssigkeiten – eine neue Anwendung zur Testung auf Pyrogenfreiheit mit dem human Vollbluttest

Die Qualität von Dialyseflüssigkeiten in der Nierendialyse stellt eine besondere Herausforderung dar. Die Mengen der verwendeten Flüssigkeiten, die mit dem Patienten in Kontakt kommen, die Herkunft des notwendigen (Dialyse) Wassers und die direkte Zubereitung der gebrauchsfertigen Lösung am Patienten direkt vor Dialysebeginn stellen einige kritische Größen dar. Ein Qualitätsmerkmal ist die Pyrogenfreiheit. Als Leitpyrogen wird auf Endotoxinfreiheit (Lipopolysaccharid, LPS) in der Regel mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) geprüft. Der neue humane Vollblutpyrogentest zeigte sich in ersten Versuchen auch für diesen Problembereich anwendbar, sowohl für das Dialysewasser, als auch für Dialysierflüssigkeit und Konzentratlösungen.

Der dialysepflichtige Patient kommt in der Hämodialyse pro Dialysetag mit ungefähr 20 bis 25 l Dialysierflüssigkeit in Kontakt, dies dreimal pro Woche. Im

Dialysezentrum wird diese Flüssigkeit vor Ort aus drei Komponenten zusammengemischt: Dialysewasser, Konzentratlösung (Variable u.a. die Kaliumkonzentration) und Bikarbonatpuffer. Die fertige Dialyselösung kommt mit dem Patienten entweder indirekt über die Dialysemembran, an der es zum Stoffaustausch mit dem Blut kommt, in Kontakt oder sie wird nach einem weiteren Sterilfiltrationsschritt als Infusat direkt dem Patienten (online) intravenös infundiert. Als mögliche Kontaminationen nehmen neben Partikeln und Mikroorganismen auch deren Sekrete und Abbauprodukte in Form von Pyrogenen eine wichtige Stellung ein. Der Materialkontakt (Dialysemembran, Schläuche, Filtereinheiten) hat für die Biokompatibilität eine weitere wichtige Bedeutung.

Das Spektrum der beteiligten Keime bei der Kontamination ist sehr heterogen; der Anteil der Bakterien verteilt sich mit ca. 94% auf gramnegative (zumeist Pseudomonas) und ca. 6% auf grampositive. Etwas seltener kommen Hefen und Fadenpilze vor. Nicht zu vernachlässigen sind Kontaminationen, die in mit Leitungswasser zubereiteten Desinfektionslösungen bei der vielerorts üblichen Wiederaufbereitung von Dialysatoren, die zudem mit unsterilem Wasser durchspült werden, übertragen werden können. Trotz Desinfektion bleiben an die Membran gebundene Pyrogene biologisch aktiv. Augenfällige klinische Konsequenzen (Häufigkeit in verschiedenen Studien 0,5 bis 22% der Dialysen) sind die Kurzzeitfolgen mit den bekannten pyrogenen Reaktionen wie Fieber, Hypotonie, Schock und im Extremfall Multiorganversagen. Als später Schaden treten Langzeitfolgen auf wie Immunschwäche, Amyloidose (z.B. Karpaltunnelsyndrom), Arteriosklerose und vermindertes Ansprechen auf Erythropoetin.

Die Prüfung auf Pyrogenfreiheit hat somit eine besondere Relevanz. Der neue humane Vollbluttest mit seinen Vorteilen der Speziesrelevanz und Prüfung eines großen Pyrogenspektrums könnte sich in der Klinik als besonders attraktiv erweisen, da Blut in diesem Bereich unkompliziert vorhanden ist. Es ist sogar denkbar, patientenrelevant mit individuellem Blut auf mögliche pyrogene Reaktionen zu testen. Für die verschiedenen Flüssigkeiten Wasser (Qualität

der Wasseraufbereitung), Dialysierflüssigkeit und in ersten Versuchen Konzentratlösungen wurden die bekannten Protokolle des Vollbluttests soweit optimiert und adaptiert, dass die empfohlenen Grenzwerte von 0,25 IU internationalem Referenzendotoxin detektiert werden können. Die Probenstellung erfolgte in Kooperation mit dem Caritaskrankenhaus Bad-Mergentheim (Dialysezentrum, Prof. Kult). Weitere Versuche sollen insbesondere die Prüfbarkeit von verschiedenen Rezepturen der Konzentratlösungen ermöglichen und weitere relevante Keime (Pseudomonaden) wie auch Nicht-Endotoxine (grampositive und Pilze) fokussieren.

S. Fennrich, I. Kindinger, I. Seuffert, T. Hartung, A. Wendel, Universität Konstanz

Medical Devices als neues Anwendungsgebiet der Prüfung auf Pyrogene mit dem Humanen Vollbluttest

Die Vielfalt von Medizinprodukten hinsichtlich Größe, Form, Material, Art der Anwendung etc. ist außerordentlich groß. Biologische Prüfungen an derartigen Produkten können Schwierigkeiten bereiten, da eine einheitliche Vorgehensweise aufgrund der Produktvielfalt nicht gegeben ist. Dies wirkt sich auch auf die Prüfung von Medizinprodukten auf Pyrogene aus. In Abhängigkeit von der Applikationsart ist die Prüfung auf Pyrogene bei den nachfolgenden Medizinprodukten als Endproduktprüfung vorgeschrieben oder empfehlenswert:

- ▶ Produkte mit direktem/indirektem Kreislaufblut-Kontakt z.B. Katheter, Gefäßimplantate, Blutbeutel,
- ▶ ophthalmologische Produkte z.B. Silikonöl, Hyaluronsäure, Kontakt- und Intraokularlinsen,
- ▶ invasive Implantate z.B. chirurgische Implantate, Dentalimplantate,
- ▶ kraniale Produkte z.B. Sonden, Katheter,
- ▶ Produkte mit indirektem Blutkontakt z.B. Verbandstoffe, Bauchtücher, Tupfer, Handschuhe.

Weiterhin sind Prüfungen auf Pyrogene in der Herstellung, der Produktentwicklung und Biokompatibilitätsprüfung, als Inprozess-Kontrolle und im Rahmen der Validierung von Entpyrogenisierungsverfahren ein wichtiger Bestandteil der Qualitätskontrolle. Die bestehenden

Testmethoden (LAL-Test und Kaninchenpyrogentest) sind in den Arzneibüchern wie z.B. der Europäischen Pharmakopöe und der United States Pharmacopoeia genau beschrieben. Einzelne ISO-, EN- und DIN-Normen sowie diverse Leitfäden z.B. der FDA machen Angaben zu Grenzwerten, Probenvorbereitung und Probenzahlen. Eine zentrale Richtlinie, die die Pyrogenprüfung von Medizinprodukten unter Berücksichtigung der Vielfalt dieser Produkte detailliert regelt, gibt es bislang jedoch nicht. Die Arbeitsgruppe ISO TC 198 plant daher ein neues Normungsvorhaben, das sich mit dieser Thematik beschäftigen wird.

Neben dem Kaninchenpyrogentest und dem LAL-Test steht nun der humane Vollbluttest als weiteres Testsystem zur Erfassung von Pyrogenen zur Verfügung. Dieser wurde auf ausgewählte Medizinprodukte (Hyaluronsäure, Glycerin, Glucosepolymere und Gelatine als Inhalts- oder Rohstoffe) angewendet, um erste Erfahrungen zu sammeln. Die ausgewählten Produkte erwiesen sich im LAL-Test als problematisch. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Produkte waren mit dem humanen Vollbluttest auf Pyrogene prüfbar. In einzelnen Tests ergaben sich Hinweise auf Störungen, wie sie auch im LAL-Test auftreten können. Für solche Fälle müssen Methoden zur Beseitigung dieser Interferenzen entwickelt werden. Eine produktspezifische Validierung zu Beginn der Prüfungen ist, wie auch für den LAL-Test, weiterhin notwendig.

“Mit dem humanen Vollbluttest ergeben sich für die Prüfung von Medizinprodukten eine Reihe neuer interessanter Möglichkeiten.”

Die Produkte können im Vollblut direkt inkubiert werden. Damit vereinfacht sich die für den LAL- und Kaninchenpyrogentest oft sehr schwierige und aufwendige Probenvorbereitung. Es können zudem Pyrogene, die nicht durch Extraktion vom Material ablösbar sind, detektiert werden. Wie im Kaninchenpyrogentest werden mittels des humanen Vollbluttests nicht nur die Endotoxine der gramnegativen Bakterien, sondern die Gesamtheit der Pyrogene

erfasst. Dies ist um so bedeutungsvoller, da bei Medizinprodukten grampositive Bakterien und Pilze, die keine Endotoxine bilden, die Hauptkontaminanten darstellen.

A. Friedrich, H. Noll, K. Schünemann, W. Riedel, Bioservices, Planegg

Verbesserter Nachweis pyrogener Kontaminationen auf Polymeroberflächen mit Hilfe des neuen PyroCheck®-Assays im Vergleich zum LAL Test

Die Pyrogenfreiheit von Verbrauchsmaterialien ist ein wesentliches Qualitätsmerkmal, denn sowohl die Kultivierung von Zellen als auch die Aufbewahrung medizinischer Produkte muss frei von Pyrogenen erfolgen. Pyrogene umfassen u.a. die Endotoxine aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien und die Lipoteichonsäuren aus der Zellwand Gram-positiver Bakterien.

Gegenwärtig werden Endotoxine in Plastikgefäßen mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-(LAL)Test nachgewiesen, indem die Gefäße mit Wasser gespült und die Spüllösung anschließend im LAL untersucht wird. Diese Methode hat jedoch verschiedene Nachteile. So ist zum einen die Wiederfindung von Pyrogenen sehr insuffizient [Roslansky et al., J. Parental Sci. Techn. 1991; 45: 83–87] und zum anderen können mit dem LAL nur die Endotoxine gramnegativer Bakterien nachgewiesen werden. Zudem hängt der LAL auch von der Qualität des verwendeten Wassers ab [Duner, J. Pharm. Sci. Techn. 1995; 49: 119–121].

Durch die Entwicklung des neuen PyroCheck®-Assays (PCA) konnten diese Nachteile umgangen werden. Beim PCA wird humanes Vollblut in Kontakt mit der zu testenden Oberfläche inkubiert. Sollte eine pyrogene Kontamination vorliegen, erfolgt die Stimulation der Sekretion verschiedener an der Fieberantwort beteiligter Zytokine. Zu diesen zählen der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF alpha) und die Interleukine IL-6 und IL-1 beta. Diese genannten Zytokine können dann mit spezifischen ELISAs gemessen werden. Wir konnten in mehreren Ansätzen die Überlegenheit des neuen Pyrocheck®-Assays gegenüber dem LAL darstellen. Die Vorteile umfassen in Kürze:

- ▶ höhere Sensitivität für den Pyrogen-nachweis auf Polymeren wie Polysty-

rol (PS) und Polypropylen (PP): Steigerung der Sensitivität auf PS mindestens um den Faktor 2, auf PP mindestens um den Faktor 8,

- ▶ erweiterter Nachweis (z.B. auch von Pyrogenen grampositiver Bakterien); damit sind die Produkte nicht nur endotoxin- sondern wirklich pyrogenfrei.
- ▶ Anwendung eines humanen Testsystems für in der Humanmedizin verwendete Produkte (keine Speziesvariation z.B. bei der Fieberantwort).

Eine Erklärung für die höhere Sensitivität des PCA scheint unseres Erachtens in dem direkten Kontakt des Testsystems (humanes Vollblut) mit der Polymeroberfläche zu liegen. Daher werden unsere Produkte für die Zellkultur zukünftig mit dem neuen PyroCheck®-Assay getestet.

E. Petri, A. van de Ploeg, B. Habermaier, S. Fennrich, Greiner, Frickenhausen und Universität Konstanz

Pyrogene im Staub-Marker zur Beurteilung einer aerogenen Belastung mit organischen Stäuben?

Belastungen mit luftgetragenen, organischen Stäuben können zu verschiedenen respiratorischen Krankheitserscheinungen führen. Zur Einschätzung einer Belastung mit organischen Stäuben wird neben der Konzentration an luftgetragene Staub, wodurch vor allem die unspezifischen Wirkungen des Staubes charakterisiert werden, sein Endotoxingehalt herangezogen. Hierfür wurde ein Richtwert von 50 EU/m³ sowie ein entsprechendes Messverfahren, das auf dem Limulus-Test basiert, durch das “Berufsgenossenschaftliche Institut für Arbeitssicherheit” zur Diskussion gestellt.

Endotoxine zur Beurteilung des gesundheitsgefährdenden Potentials durch luftgetragene organische Stäube heranzuziehen, ist vor allem durch zwei Punkte begründet. Erstens spielen Endotoxine bei der Pathogenese verschiedener respiratorischer Erkrankungen, welche durch organische Stäube verursacht werden, eine Schlüsselrolle. Zweitens geht die endotoxische Aktivität weit über den bakteriellen Zelltod hinaus, so dass es in verschiedenen Stäuben zu ei-

ner Akkumulation dieses Toxins kommen kann. Neben den von gramnegativen Bakterien abstammenden Endotoxinen kommen in organischen Stäuben regelmäßig noch eine Vielzahl von anderen Substanzen vor, welche ebenfalls Atemwegsaffektionen hervorrufen können, aber nicht durch den Limulus-Test nachgewiesen werden (z.B. Zellwandbestandteile von Schimmelpilzen oder grampositiven Bakterien). Um neben Endotoxinen auch diese Substanzen quantitativ zu erfassen, könnte die Pyrogentestung mittels Vollblut eine mögliche Alternative darstellen. Ebenfalls könnte dieses Testsystem die Möglichkeit eröffnen, synergistische Effekte von verschiedenen biologischen Inhaltsstoffen bei der Entstehung von Atemwegserkrankungen zu untersuchen, da viele dieser Stoffe wie Endotoxin ihre pathophysiologischen Wirkungen über die Aktivierung von Alveolarmakrophagen entfalten.

Hinsichtlich der praktischen Durchführung des Vollbluttestes zur Beurteilung organischer Staubbelastungen wurden zwei Varianten getestet. Erstens wurde Staub durch Filtration gesammelt und die pyrogene Aktivität (IL-1 β -Ausschüttung) des auf Filtern niedergeschlagenen Staubes im Vollbluttest bestimmt. Hierbei ist eine Direktinkubation der beaufschlagten Filter möglich. Ein Extraktionsschritt wie er zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration des Staubes im Limulus-Test nötig ist, braucht hierbei nicht zu erfolgen. Zweitens wurden luftgetragene Staubpartikel mittels Impingement (AGI-30 Impinger) in pyrogenfreiem Wasser gesammelt und deren pyrogene Aktivität mittels Vollbluttest ermittelt. Dieses Sammelverfahren bietet die Möglichkeit, gleichzeitig noch andere lufthygienische Parameter wie z.B. die Konzentration an luftgetragenen Bakterien oder Endotoxin in der Sammlerflüssigkeit zu bestimmen.

Mittels beider getesteten Methoden war es möglich, die pyrogene Aktivität in den gesammelten Staubproben zu quantifizieren. Weitere systematische Untersuchungen haben zu zeigen, inwieweit die pyrogene Aktivität von luftgetragener Staub das gesundheitsgefährdende Potential von organischen Staubbelastungen widerspiegelt.

B.-A. Zucker, S. Fennrich, T. Hartung, A. Wendel, Freie Universität Berlin und Universität Konstanz

Für die technische Durchführung Dank an: Gregor Pinski, Ina Seuffert, Astrid Leja, Ilona Kindinger, Karin Burger

Ausblick

Der humane Vollblutpyrogentest wurde in verschiedenen Anwendungen evaluiert und prävalidiert. Er ist mittlerweile auch in einer Kit-Version von DPC Biermann, Bad Nauheim, erhältlich. Die vielversprechenden Befunde insbesondere der Evaluierungen für Biologika am Paul-Ehrlich-Institut und für Pharmazeutika an der Universität Heidelberg jeweils unter Beteiligung von Industriepartnern haben die Grundlage für die nächsten Schritte hin zu einer im Arzneibuch verankerten Methodik gelegt:

Ab Januar 2000 beginnt eine internationale Validierungsstudie im Ringversuch unter Beteiligung von zehn europäischen Partnern. Hierbei sollen die Transferierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Methode untersucht werden. Nach Absprachen mit Vertretern von Europäischer Pharmakopoe und amerikanischer FDA auf einem kürzlich durchgeführten ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)-Workshop zu "Advanced Pyrogen Testing" sollen in diese Validierung auch Referenzlaboratorien dieser Behörden einbezogen werden.

Das European Directorate for the Quality of Medicine (EDQM) hat der Pharmakopoe die Einrichtung einer Expertenkommission zur Erarbeitung einer Verfahrensmonographie vorgeschlagen.

Im Rahmen eines Fortsetzungsantrages an das BMBF soll erarbeitet werden, ob auch standardisiertes, kryopräserviertes Blut für den Test verwendet werden kann, ein Schnelltest entwickelt werden und die Validierung für erste Biologika erfolgen. Für die sich abzeichnenden neuen Anwendungen entstehen zur Zeit Netzwerke für die Evaluierung der Methodik, nämlich insbesondere für die Prüfung von Medical Devices, die Dialyse und den Nachweis luftgetragener Pyrogene. Dies wird ergänzt durch Einzelprojekte zur Prüfung von Blutkonserven, Phytopharmaka und Impfstoffe.

"Die Einführung von Vollblut als Zellsystem läßt den Traum von der menschlichen Fieberreaktion im Reagenzglas Wirklichkeit werden."

Insgesamt besteht der Eindruck, dass die Einführung von Vollblut als Zellsystem den Traum von "der menschlichen Fieberreaktion im Reagenzglas" Wirklichkeit werden läßt. Auch wenn sich der zukünftige Stellenwert und die Anwendungsmöglichkeiten gerade erst abzeichnen, so besteht schon jetzt Grund zu der Hoffnung, dass bald eine Ergänzung zum Limulus-Test und ein Ersatz für den Kaninchen-Pyrogen-Test verfügbar ist.

A. Wendel, T. Hartung, Universität Konstanz