

Prüfung auf Bakterien-Endotoxine gemäß European und United States Pharmakopoeia

Antje Kalettka*, Holger Miething

Klosterfrau Berlin GmbH, Quality Unit;

*Absolventin des Masterstudiengangs Toxikologie, Charité-
Universitätsmedizin Berlin

Hintergrund

Bakterien-Endotoxine sind hitzestabile Lipopolysaccharide, die aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien bei der Zellyse freigesetzt werden. Diese bieten der gramnegativen Zelle Schutz und vermitteln Antigene. Sie bestehen aus einem Kernpolysaccharid, der O-spezifischen Seitenkette und dem hydrophoben Teil Lipid A, wobei der Lipid A-Anteil für die Toxizität verantwortlich ist. Bakterien-Endotoxine sind aktiv pro-inflammatorisch und starke exogene Pyrogene, die bei Mensch und Tier unspezifische Entzündungsreaktionen wie Fieber, sowie Störungen des Gastrointestinaltraktes und der Blutgerinnung bis hin zum septischen Schock auslösen können. Zum Schutz der Gesundheit des Menschen werden Arzneimittel auf Bakterien-Endotoxine gemäß der European und United States Pharmakopoeia geprüft.¹

Prüfung auf Bakterien-Endotoxine

Der klassische Test wird mit dem Rabbit Pyrogen Test (RPT) durchgeführt, welcher 1940 in die European Pharmakopoeia (EP) und die United States Pharmakopoeia (USP) aufgenommen wurde. Dabei werden die Kaninchen in einer Box über mehrere Stunden fixiert und die Körpertemperatur vor und nach der Injektion der Probe rektal gemessen. Die Kaninchen werden für diesen Test mehrfach eingesetzt und erleiden z. B. lokale Entzündungen an der Injektionsstelle und schwere Rückenverletzungen.

Aus Gründen des Tierschutzes wurde 1964 der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) von F. Bang und J. Levin als alternative Methode entwickelt. Seit 1980 ist dieser Test in EP unter 2.6.14 und USP unter <85> gesetzlich verankert. Der LAL-Test beruht auf der natürlichen Immunabwehr des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. Bei einem Kontakt mit Bakterien-Endotoxinen wird durch freigesetzte Enzyme aus den lysierten Amöbozyten eine Blutgerinnung ausgelöst. So wird die Prüfsubstanz mit dem Amöbozyten-Lysat des *Limulus polyphemus* versetzt und bei Anwesenheit von Bakterien-Endotoxinen eine Trübungszunahme gemessen. Dabei schreiben EP und USP unterschiedliche Techniken vor.^{2, 3}

Nachteile des LAL-Tests sind, dass er nur Pyrogene gramnegativer Bakterien erkennt und einige Substanzen den Test stören. Dazu gehören Medikamente, die das Lipopolysaccharid maskieren, das Gerinnungssystem inhibieren bzw. verstärken, oder zu falsch positiven Ergebnissen durch pflanzliche Arzneimittel mit pyrogenen Strukturen (Glukane) führen. Vom ethischen Standpunkt her ist der LAL-Test kritisch zu betrachten. Er ist zwar kein Tierversuch im engeren Sinne, jedoch werden die Pfeilschwanzkrebse gefangen, 20% der Hämolymphe entnommen und die Tiere zurück ins Meer gebracht. 15 % der Krebse überleben die Prozedur nicht.

Im Zuge der Entwicklung alternativer Methoden zu Tierversuchen und gemäß dem 3R Prinzip (reduce, refine, replace) wurde der Rabbit Pyrogen Test durch den Monozyten-Aktivierungstest (MAT) ersetzt. Bei diesem *in vitro* Test werden aus frischem oder cryokonserviertem humanen Vollblut Monozyten isoliert und mit der Prüfsubstanz versetzt. Pyrogene Substanzen aktivieren die Monozyten, welche proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β ausschütten. Die Messung der Monozyten-Stimulation erfolgt mit IL-1 β spezifischem ELISA.⁴ 1995 wurde der MAT von Prof. Thomas Hartung und Prof. Albrecht Wendel an der Universität Konstanz entwickelt, 2005 von der ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) validiert und erst 2010 im Europäischen Arzneibuch verankert. 2012 wurde er von der FDA für die USA legitimiert. Vorteile des MAT sind seine hohe Empfindlichkeit, gute Reproduzierbarkeit und sein breites Pyrogenspektrum inklusiver nicht-endotoxiner Substanzen.¹

Fazit

Seit 1960 wurden alternative Methoden zum RPT zur Prüfung auf Bakterien-Endotoxine, wie der LAL-Test und der MAT entwickelt. Aktuell wurde der RPT durch den MAT in der European Pharmacopoeia unter 2.6.30 ersetzt. Der MAT ersetzt bis zu 170.000 Kaninchen pro Jahr in Europa. Für nicht validierte Arzneimittel wird der RPT jedoch noch angewendet. Als Standardmethode zur Prüfung auf Bakterien-Endotoxine wird immer noch der LAL-Test gemäß EP und USP durchgeführt. Dieser soll in den nächsten Jahren durch einen weiterentwickelten MAT abgelöst werden. Die FDA hat den MAT zwar 2012 für die USA legitimiert, in die aktuelle Ausgabe der United States Pharmacopoeia 38 wurde dieser aber noch nicht aufgenommen. Die Entwicklung alternativer Testmethoden wird nur mangelhaft gefördert. So vergehen von der Entwicklung bis zur gesetzlichen Verankerung in der European und United States Pharmacopoeia und dessen Wahl als Standardmethode bis zu 20 Jahre.

- 1) Rieth M (2012) Pharmazeutische Mikrobiologie; Qualitätssicherung, Monitoring, Betriebshygiene. Wiley-VCH, Weinheim.
- 2) Europäische Pharmacopöe (2014) 8. Ausgabe; Amtliche deutsche Ausgabe. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
- 3) United States Pharmacopoeia 38 (2015)
- 4) Holtkamp B, Schmitz G, Hartung T (2010) In vitro-Pyrogentest - Nachweis eines breiten Pyrogenspektrums im Monozyten-Aktivierungstest. BIO spektrum 16: 779–781