



# De Endotoxinentest

## Regelgeving en Uitvoering

Door: Bert Rietdijk  
Afdelingshoofd Farmaceutisch en  
Toxicologisch Laboratorium  
Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

### Deel 1 – Wet- en Regelgeving

#### Inleiding

Aan het einde van de jaren zeventig (van de vorige eeuw) deed de endotoxinentest zijn intrede in de apotheeklaboratoria. Deze test was toen (nog) een onofficiële test, de test werd uitgevoerd i.p.v. de officieel voorgeschreven 'Test op Pyrogenen'. In de afgelopen vijftientig jaar heeft de endotoxinentest zich ontwikkeld tot een volwaardige farmaceutische testmethode en is in de loop der jaren dan ook opgenomen in de diverse farmacopees. Het was echter jammer dat de verschillende farmacopees geen uniforme testmethode beschreven. In de uitvoering van de test waren duidelijk verschillen, m.n. tussen de Amerikaanse Farmacopee (USP) en de Europese Farmacopee (EP). Het belangrijkste verschil in de methodieken was de afleiding van de controle standaard endotoxine (CSE) oplossing, de oplossing waarmee de test werd geïnterpreteerd en/of gekwantificeerd. De verschillende farmacopees gebruikte voor de standaardisatie van deze controlestandaarden verschillende standaarden en deze standaarden waren niet (of lastig) op elkaar te herleiden.

Gelukkig is daar nu een einde aan gekomen. Met ingang van 1 juli 2000 is het 2<sup>e</sup> Supplement van de USP 24-NF 19 van kracht geworden. In dit supplement worden de verschillende testmethodieken officieel vastgelegd en daarmee ook officieel goedgekeurd voor uitvoering als farmaceutische testmethodieken. Ook het 4<sup>e</sup> Supplement van de EP, dat met ingang van 1 januari 2001 in Nederland als wet gehanteerd

moet worden, beschrijft deze testmethodieken officieel. Daarnaast geldt als belangrijkste punt dat de uitvoering van deze testmethodieken in beide farmacopees nu uniform beschreven zijn, of zoals dat zo mooi heet, de methodieken zijn geharmoniseerd. Bij deze harmonisatie in regelgeving zijn ook nog de Japanse Farmacopee en de FDA Guideline betrokken. Deze officiële erkenning van de diverse testmethodieken heeft belangrijke gevolgen voor de test uitvoering op onze laboratoria.

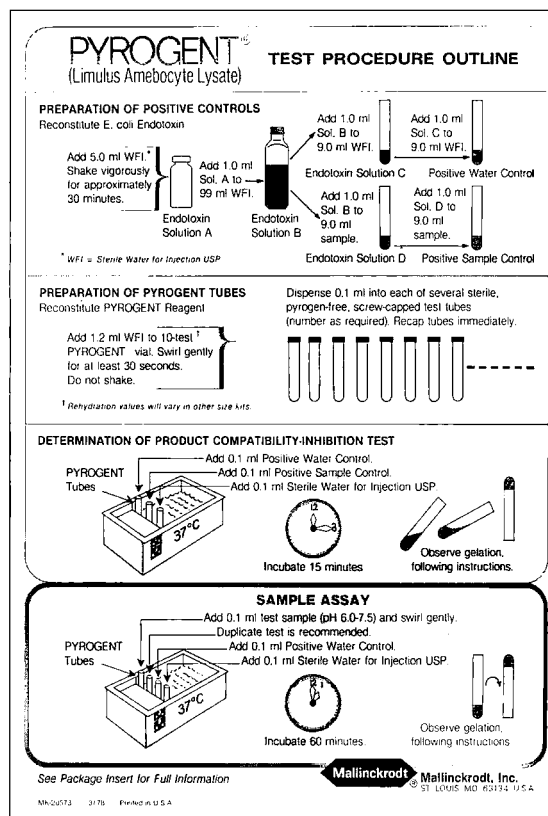
#### De Test

Zoals al gezegd werd de endotoxinentest door onze laboratoria ingevoerd als vervanging van de officiële 'Test op Pyrogenen'. In veel laboratoria wordt de endotoxinentest daarom nu nog steeds pyrogeentest genoemd, hoewel deze benaming feitelijk onjuist is.

Bij de officiële uitvoering van de pyrogeentest werd (per te testen product) een drietal konijnen ingespoten met een vooraf berekende hoeveelheid te testen product. Indien binnen 3 uur na inspuiten van deze hoeveelheid product de lichaamstemperatuur van het konijn met niet meer dan 0,5°C steeg, dan werd het product pyrogeenvrij verklaard. Het uitvoeren van deze testen zorgde voor nogal wat problemen, niet in de laatste plaats door de uitgebreide konijnenstal die het laboratorium erop na moest houden (c.q. zou moeten houden!). Voor veel van de ziekenhuisapothek laboratoria was dit een onmogelijke opgave! Het op de markt brengen van de "Limulus Amoebocyte Lysaat Test" (= LAL-test) was daarom een welkome, en ook een noodzakelijke, aanvulling op het analysepakket van de meeste laboratoria. De firma BYK kwam als één van de eerste leveranciers met een test op de

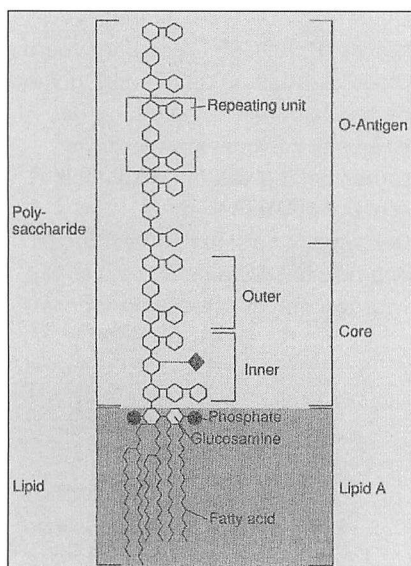
Nederlandse markt. Een test geproduceerd door de firma MALLINCK-RODT, de test heette toen eenvoudigweg: 'PYROGENT', en werd met een uitgebreide promotiecampagne op de Nederlandse markt geïntroduceerd.

Ik kan me nog goed herinneren dat ik uitgebreide discussies heb gevoerd met de vertegenwoordiger van de firma BYK, drs. C.L. de Graaf, over de uitvoering van de test en de geschiktheid van de test voor de analyse van de diverse infusie-, spoel- en injectievloeistoffen. De 'oudere' analisten onder ons zullen de bijgaande poster (zie afbeelding 1 hieronder) nog wel herinneren. Op deze poster werd aangegeven hoe de 'PYROGENT-test' uitgevoerd moest worden. In de uitvoering van deze gelclot-test is in de loop der jaren niet zo veel veranderd. De samenstelling van het reagens is echter wel veranderd! Deze eerste endotoxinentest moest zich nog bewijzen naast de wettelijk voorgeschreven 'Test op Pyrogenen'



Afbeelding 1.

(= konijntest). Er is echter ooit uitgezocht dat de drempeldosering waarbij een konijn een koortsreactie geeft (d.w.z. een stijging in lichaamstemperatuur van meer dan 0,5°C) in de buurt ligt van de 1 nanogram *gezuiverd* E.coli-endotoxine per kilogram lichaamsgewicht. Met dit gegeven in het achterhoofd zou je kunnen bedenken dat er een verband te leggen is tussen aan de ene kant de officiële 'Test op Pyrogenen' (d.w.z. meting van de koortsreactie) en aan de andere kant de nieuw geïntroduceerde endotoxinentest (d.w.z. meting van de endotoxinenconcentratie), niets is echter minder waar!



Afbeelding 2.

Als we het endotoxinemolecuul bekijken, (zie afbeelding 2 en 3), dan zien we een relatief groot molecuul. De grootte wordt o.a. bepaald door een relatief groot, inactief, oligosaccharide gedeelte (= een polysaccharide keten) met daarnaast een relatief klein lipide-A gedeelte. Dit lipide-A gedeelte is uiteindelijk verantwoordelijk voor de opwekking van de koortsreactie in de gastheer. Door dit verschil in grootte, en samenstelling van de oligosaccharideketen, van het inactieve en actieve deel van het molecuul bleek het uiteindelijk onmogelijk om te komen tot een eenduidig gedefinieerd *gezuiverd* endotoxine. Een eenduidig

gedefinieerd *gezuiverd* endotoxine is nodig om een endotoxinentest te ontwikkelen die een concentratie kan weergeven in grammen per milliliter of in millimolen per milliliter.

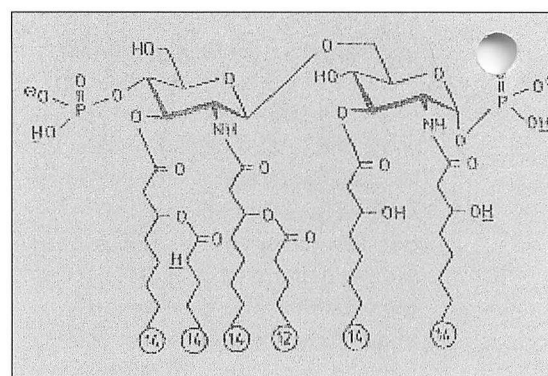
Om nu toch een (semi-) kwantitatieve test te ontwikkelen heeft men in Europa gekozen voor de eenheid Endotoxine Unit/milliliter (= EU/ml) als eenheid om de besmetting met endotoxinen in uit te drukken. In Amerika werd de eenheid International Unit/milliliter (= IU/ml) gehanteerd. Deze verschillende eenheden waren ook noodzakelijk, omdat de referentiestandaarden anders gedefinieerd waren.

Bij de keuze van een arbitrair vastgestelde eenheid moeten we altijd een referentiestandaard afspreken. Dat is ook gebeurd, zowel voor de EU/ml als voor de IU/ml, alleen is het jammer dat de deskundigen niet dezelfde referentiestandaard uitzochten/aanwezen. Er ontstond zodoende een verschil tussen de gekozen referentiestandaarden in Amerika en Europa. Deze verschillen hebben tot het jaar 2000 stand gehouden. Toen zijn de methodieken, zoals gezegd, geharmoniseerd, wat zoveel wil zeggen als gelijk getrokken.

De officiële 'Test op Pyrogenen' is door de Amerikaanse Farmacopee en de Europese Farmacopee al een aantal jaren geleden vervangen door de (semi-kwantitatieve) gelclot endotoxinentest. De endotoxinentest had zich daarmee een plaats verworven in de farmaceutische laboratoria, een belangrijke doorbraak.

De ontwikkeling van de endotoxinentest stond uiteraard ook niet stil. Naast een verbetering van de zuiverheid van de gebruikte endotoxinen, door gebruik te maken van betere zuiveringsmethoden, heeft men ook veel tijd en energie gestoken in de ontwikkeling van een aantal nieuwe, c.q. afgeleide testen. De officiële endotoxinentest was een semi-

kwantitatieve test, de concentratie aan endotoxinen was bij benadering aan te geven met een marge van 50-200% (door de gebruikte 2-log verdunningen). Een gegeven dat niet voor een ieder bruikbaar bleek te zijn. Een kwantitatieve test werd ontwikkeld. Dit werd een spectrofotometrische test waarbij met behulp van een calibratielijne de te onderzoeken oplossingen gekwantificeerd konden worden. Deze test is echter een afgeleide test van de gelclot-test en is tot voor kort door geen van de farmacopees officieel erkend. Ook de daaruit afgeleide kinetische testen waren tot voor kort niet officieel erkend



Afbeelding 3.

## De Harmonisatie

Wat zijn nu de directe gevolgen van deze harmonisatie voor de uitvoering van de endotoxinentest op onze laboratoria?

De farmacopees hebben hun standaarden, voor de USP het Lot G en voor de EP het BRP3, nu beide gekalibreerd tegen de WHO-standaard 94/580. Door deze harmonisatie van de standaarden mogen we nu stellen dat 1 IU/ml = 1 EU/ml!

Ook de Japanse Farmacopee heeft de standaard voor de endotoxinentest tegen deze WHO-standaard gekalibreerd. Daarnaast erkennen de drie farmacopees nu de twee LAL-methodieken, we onderscheiden de gelclot-methodiek en de fotometrische-methodiek, deze methodieken zijn op hun beurt weer onder te verdelen in verschillende uitvoeringen of technieken. De Europese Farmacopee onderscheidt de volgende testen:

- *Methode A*  
de gelclot-methode  
– de limit test
- *Methode B*  
de gelclot-methode  
– de semi-kwantitatieve test
- *Methode C*  
de turbidimetrische-methode  
– de kinetische test
- *Methode D*  
de chromogene-methode  
– de kinetische test
- *Methode E*  
de chromogene-methode  
– de eindpunts test
- *Methode F*  
de turbidimetrische methode  
– de eindpunts test

Al met al dus twee methodieken onderverdeeld in zes technieken om de endotoxinentest uit te voeren, een aanzienlijke uitbreiding t.o.v. de voorheen vaak officieel voorgeschreven kwantitatieve gelclot-test.

Deze methodieken en technieken worden nu ook erkend door de FDA en zijn beschreven in de FDA-Guideline, de door de FDA gebruikte referentie-standaard (= EC-6) is nu ook gekalibreerd tegen de WHO-standaard. Het maakt, in principe, nu niet meer uit voor welke techniek (= test) we kiezen voor het analyseren van de endotoxinen in farmaceutische producten. In de farmacopees is echter wel opgenomen dat de gelclot-methode nog steeds geldt als basismethode, de officiële referentiemethode. De limit-test moet gebruikt worden als er getwijfeld wordt over de juistheid van een uitslag die verkregen is met één van de andere technieken. Validatie van de andere technieken moet dan ook gebeuren t.o.v. de gelclot-limit test!

Nu vast gesteld is dat we iedere test kunnen en mogen gebruiken voor het aantonen van de afwezigheid van endotoxinen in onze farmaceutische producten moeten we allereerst vaststellen welke voorbereidingen we moeten treffen alvorens we de test kunnen gaan uitvoeren.

## De Uitvoering

### De Berekeningen

Het blijft een vast gegeven dat we eerst moeten vaststellen of een bepaald product wel geanalyseerd kan worden met een endotoxinentest. Hiervoor moeten we allereerst bekijken wat de toedieningsvorm is van het product dat we willen analyseren. Daarna moeten we uitrekenen wat de maximale endotoxine concentratie in het te analyseren product mag zijn, uitgaande van de maximale dosering per uur die een patiënt van dit product mag ontvangen. Met behulp van deze twee parameters, de maximale endotoxine concentratie en de maximale dosering, kunnen we de verdunningsfactor berekenen waarmee het te analyseren product maximaal verdund mag worden, de MVD (= *MVD, Maximum Valid Dilution*).

Voor de verschillende toedieningsvormen zijn er verschillende drempeldoseringen (= *K*) vastgesteld. Deze drempeldoseringen zijn de maximaal toegestane doseringen zonder dat er een toxische reactie (= koortsreactie) zal optreden bij een patiënt. Zie de tabel hieronder.

Naarmate het toegediende volume van een product groter wordt zal de maximale concentratie aan endotoxinen uiteraard lager moeten zijn. Uitgaande van de maximale uur-

dosering (= *M*) uitgedrukt in ml/kg van het te analyseren product kunnen we de maximaal toegestane endotoxine concentratie (= *MAEC, Maximum Allowable Endotoxin Concentration*) uitrekenen.

$$MAEC = K / M = \frac{EU/kg}{ml/kg} = EU/ml$$

Met behulp van deze gegevens kunnen we de maximale verdunningsfactor (= *MVD, Maximum Valid Dilution*) berekenen. Bij deze berekening moeten we nog rekening houden met de gevoeligheid (=  $\lambda$ ) van het te gebruiken Limulus Amoebocyten Lysaat. De berekening is als volgt:

$$MVD = \frac{MAEC}{\lambda} = \frac{K / M}{\lambda} = \frac{EU/ml}{EU/ml}$$

Van het te analyseren product hebben we nu een aantal gegevens verzameld en berekend; de *K*, de *M*, de *MAEC* en de *MVD*.

### Maar wat moeten en kunnen we hier nu mee?

Het belangrijkste gegeven is de *MAEC*, want aan de hand van dit gegeven wordt het product uiteindelijk beoordeeld. Voor de praktische testuitvoering is ook de te berekenen *MVD* van belang. De *MVD* geeft aan hoever we een product maximaal **mogen** verdunnen, zonder dat de verdunning een negatieve invloed heeft op het uiteindelijke resultaat. Indien een product bij deze maximale verdunning nog een positieve reactie vertoont dan moeten we tot afkeuren overgaan! Let er hierbij wel op dat de lysaatgevoeligheid (=  $\lambda$ ) van de gebruikte testuitvoering ingevoerd moet worden voor deze berekening! Het zal voor zich spreken dat de verdunningen gemaakt moeten worden met endotoxinevrij water (meestal aangeduid als pyrogeenvrij water).

### De Voorbereiding

In principe zou je met deze gegevens de endotoxinentest kunnen gaan uitvoeren. Je moet er echter nog wel

| Toedieningsvorm          | <i>K</i><br>EU/kg | EU/patiënt* |
|--------------------------|-------------------|-------------|
| Intraveneus              | 5,0               | 350         |
| Intraveneus Radiofarmaca | 2,5               | 175         |
| Intrathecaal             | 0,2               | 14          |

\* = gemiddeld gewicht patiënt is vastgesteld op 70 kg.

op bedacht zijn dat de te testen producten storende factoren kunnen bevatten. Je moet hierbij denken aan zuurteregelaars, conserveermiddelen, dextranen, e.d., deze storende factoren kunnen de uiteindelijke testuitslag beïnvloeden. Deze beïnvloeding kan zowel negatief als positief zijn, d.w.z. dat het testresultaat vals-negatief of vals-positief kan uitvallen. Deze beïnvloeding kan veroorzaakt worden door de pH van de oplossing, de chemische samenstelling van het product, de ionsterkte van de aanwezige ionen, de aanwezigheid van grotere moleculen (o.a. dextranen). Om een mogelijke invloed van deze storende factoren aan te tonen, dan wel uit te sluiten, moet je een zogenaamde 'remmings- en versterkings-test' (= 'inhibition en enhancement-test') uitvoeren. Het doel van deze test is om vast te stellen hoe de endotoxinentest op het betreffende product reageert en hoe de test van dit product in de praktijk uitgevoerd kan (c.q. moet) worden.

Voor veel producten is de MVD al in de literatuur beschreven en is dus bekend dat met deze MVD-verdunning de test met een goed resultaat uitgevoerd kan worden. Het eenmalig uitvoeren van de 'remmings- en versterkingstest' geeft je veel informatie over de toepasbaarheid van de test in de eigen laboratoriumomstandigheden (kijk voor de zekerheid wel goed naar de samenstelling van het eigen product en het literatuurproduct, zijn deze wel exact hetzelfde?).

Als eerste ga je de pH van de oplossing meten, voor een optimaal resultaat moet de pH van het product-lysaat-mengsel een pH van 6,0-8,0 hebben. Het meten van de pH van het product-lysaat-mengsel is over het algemeen vrij lastig i.v.m. het kleine volume (= 0,2 ml) dat je hebt. Vandaar dat het beter is om de pH van het uitgangspunt te meten en eventueel bij te stellen. Het bijstellen van de pH van het product kun je doen m.b.v. pyrogeen-

vrij zoutzuur 0,1M of pyrogeenvrij natronloog 0,1M. Het verdunnen van een ongebufferd product met pyrogeenvrij water wil ook wel eens tot het gewenste effect leiden. Proberen is hierbij de beste leerschool!

Het pH-neutrale (?) product kan nu verder geanalyseerd worden. In de praktijk betekent dit dat je een endotoxine calibratielijijn in het betreffende product gaat vergelijken met een endotoxine calibratielijijn in water. De calibratielijijn in product en water wordt (minimaal) gemaakt met een endotoxine concentratie van  $2\lambda$  tot  $0,5\lambda$  ( $\lambda$  = gevoeligheid van het LAL). Deze verdunningsreeks moet een 2-log verloop hebben, d.w.z. dat aan een bepaald volume product en aan eenzelfde volume water een klein volume stock-standaardoplossing endotoxine wordt toegevoegd (bv. tot een concentratie van  $2\lambda$ ). Deze oplossing wordt daarna 1:1 verdund met product resp. water (uitgaande van  $2\lambda$  wordt de concentratie dan  $1\lambda$ ), uit deze oplossing wordt een volgende 1:1 verdunning gemaakt, enz., enz.

De resultaten van beide calibratielijijnen worden met elkaar vergeleken, er mag geen groter verschil tussen de verkregen resultaten zijn dan één verdunningsstap!

Indien de productcalibratielijijn, t.o.v. de watercalibratielijijn, bij een hogere endotoxine concentratie niet meer geleert of geen spectrofotometrische of turbidimetrische reactie geeft dan mag je aannemen dat er storende factoren in het spel zijn. Welke dat zijn is uit deze gegevens niet af te leiden.

Indien de resultaten van de calibratielijijnen exact met elkaar overeenkomen dan kan de endotoxinentest voor dit product, in deze samenstelling, zonder probleem uitgevoerd worden. Indien de productcalibratielijijn meer dan één verdunningsstap verschilt met de watercalibratielijijn dan moeten we aanvullend onderzoek uitvoeren. Dit aanvullende onderzoek bestaat uit het verdunnen van een met endotoxine gespiked product tot

maximaal de berekende MVD. Ook hierbij maken we weer gebruik van een 2-log verdunningsreeks. Ieder van deze verdunningen moeten we nu analyseren met de standaard endotoxine methode. De verdunning die niet meer geleert (of een spectrofotometrische of een turbidimetrische reactie geeft) kunnen we als standaard verdunning gaan gebruiken voor het analyseren van dit product. De enige voorwaarde die hierbij nog wel geldt, is dat de verdunningsfactor niet hoger mag zijn dan de berekende MVD. Als blijkt dat de gebruikte verdunningsfactor hoger is dan de MVD dan kan dit product niet op endotoxinen geanalyseerd worden, omdat het product storende factoren bevat.

## De Analyse

Het te analyseren product is nu uitvoerig beoordeeld, zowel theoretisch als praktisch. Er van uitgaande dat de voorbereidende testen tot het gewenste resultaat hebben geleid, kunnen we nu voor dit product een standaard analyseprotocol opstellen.

Het uitvoeren van de voorbereidende analyses is een éénmalige actie. Als er aan de samenstelling van het product niets wijzigt dan mag de endotoxinentest altijd op deze wijze uitgevoerd worden. Gaat men echter aan het product sleutelen en verandert de samenstelling dan moet er (in principe) weer een nieuwe voorbereidende analyse uitgevoerd worden (het is immers een ander product geworden).

Hoe en welke analyse je nu gaat uitvoeren, de gelclot-methode of een spectrofotometrische- of misschien wel een turbidimetrische methode maakt voor het uiteindelijke resultaat niet zoveel uit. De kosten die je voor het uitvoeren van deze verschillende methodieken moet maken verschillen echter enorm! De vraag is dan ook of de kosten ook een beter (lees betrouwbaarder) resultaat opleveren?

In een volgend artikel zal ik nader ingaan op de praktische uitvoering van de endotoxinentest(en), hierbij

zal ik ook uitvoerig stilstaan, middels een vergelijkend onderzoek, bij een aantal op de Nederlandse markt verkrijgbare endotoxinentesten. In dit onderzoek hebben we ons beperkt

tot de gelclot- en de spectrofotometrische endotoxinentesten. Uit kosten overwegingen (dure apparatuur) zijn de turbidimetrische endotoxinentesten niet meegenomen in

deze vergelijking (ze zijn globaal wel te vergelijken met de spectrofotometrische endotoxinen testen).

Wordt vervolgd...