



De Endotoxinentest

Praktische uitvoering

Bert Rietdijk
Afdelingshoofd Farmaceutisch
en Toxicologisch Laboratorium
Ziekenhuis Rijnstate, Arnhem

Deel 3 – Uitvoering Limit-Test

Inleiding

Dit is het derde, en tevens laatste deel in de artikelenserie over de endotoxinentest. In de voorgaande twee delen heb ik stil gestaan bij een stukje historie en theorie (Extract, jaargang 13, nummer 3, september 2002, pag. 15 e.v.) en bij een vergelijkend onderzoek naar een aantal in Nederland verkrijgbare endotoxinentesten (Extract, jaargang 13, nummer 4, december 2002, pag. 8 e.v.).

In dit derde deel wil ik stil staan bij *een methode* om de endotoxinentest uit te voeren, waarbij we rekening gehouden hebben met de volgende zaken:

- de eisen die de Europese Farmacopee stelt
- de mogelijkheden die ons laboratorium heeft
- de kosten van de reagentia en toebehoren
- de te verkrijgen resultaten.

Zoals in het tweede deel te lezen valt geven alle door ons geteste methodieken eenzelfde diagnostische uitslag. Of men nu een gel-clot-test of een chromogeen-substraat-test gebruikt, en ik durf te stellen dat de turbidimetrische-testen hier ook aan toegevoegd kunnen worden, hoewel die niet in de vergelijkende test zijn meegenomen, de resultaten die men verkrijgt zijn vergelijkbaar!

Men moet zichzelf dan ook de vraag stellen: "*welke resultaten wil ik met de endotoxinentest?*".

Indien het gaat om het testen op '*afwezigheid van endotoxinen*' in

farmaceutische producten en in het daarvoor gebruikte 'water voor injectie' (= WFI) dan volstaat naar mijn mening het uitvoeren van de eenvoudige en goedkope gel-clot-test. Wil men echter de resultaten uitgedrukt hebben in een getal, m.a.w. wil men een kwantitatieve test uitvoeren, dan is men aangewezen op de (duurdere) chromogeen-substraat-testen of de (nog duurdere) turbidimetrische-testen.

Een overweging die ook nog mee kan spelen is het aantal producten dat men per keer in behandeling neemt. Voor kleine series voldoet de gel-clot-test uitstekend, bij grotere series kan het wenselijk zijn om naar een geautomatiseerde bepaling over te gaan, de turbidimetrische-kinetische-test heeft dan veruit de voorkeur.

Welke test kies je nu?

Na het uitvoeren van het vergelijkend onderzoek hebben wij, ondergetekende en de overige laboratorium-medewerkers, ons beraden over welke consequenties we aan de uitslag van dit onderzoek moesten verbinden. Het was ons duidelijk dat, gezien de resultaten, het in principe niet uitmaakte welke testmethodiek we zouden kiezen, ze voldeden allemaal aan de gestelde eisen!

Daarom moesten we andere criteria vaststellen om de testen te evalueren. Wij hebben deze criteria gevonden in:

1. de kosten van de verschillende testen
2. in de praktische uitvoerbaarheid van de verschillende testen.

Als we naar de aanschafprijs van de verschillende testen kijken dan komen we al gauw tot de conclusie dat de gel-clot-testen de goedkoopste testen zijn, de andere testen zijn al gauw een factor 4 tot 5 duurder (voor hetzelfde resultaat!). Ook op praktische uitvoerbaarheid scoorden de gel-clot-testen, in onze situatie, het beste. Bij ons op het laboratorium hebben we over het

algemeen kleine analyseseries en we zijn alleen geïnteresseerd in de vaststelling dat er *geen* endotoxinen in ons water of in onze farmaceutische producten aanwezig zijn. We zijn dus niet geïnteresseerd in een kwantitatieve vaststelling van het aantal endotoxinen, zo deze aanwezig mochten zijn! Daarnaast is het aantal handelingen bij de uitvoering van de gel-clot-testen aanmerkelijk eenvoudiger, en minder tijdgebonden, dan bij de uitvoering van de chromogeen-substraat-testen.

De keus bleek voor ons dus eenvoudig te zijn. We bleven onze, al in gebruik zijnde, gel-clot-test van de firma BioWhittaker trouw. Wel moest ik constateren dat mede gezien de nieuwe regelgeving en de uitvoeringsmogelijkheden op het laboratorium, een aantal aanpassingen aan onze testuitvoering noodzakelijk zouden zijn!

De keus is gemaakt, we gaan voor de gel-clot-test! Maar gelijk doet zich dan de vraag voor: gaan we dit doen volgens Methodiek A of Methodiek B van de Europese Farmacopee. Methodiek A betreft de Limit-Test, een kwalitatieve test, en Methodiek B betreft de Semi-Kwantitatieve-



Test, zoals de naam al zegt een kwantitatieve test?

Gezien het feit dat wij niet geïnteresseerd zijn in een kwantitatief resultaat hebben wij gekozen voor de kwalitatieve test; de *Limit-Test*, volgens Methodiek A van de Europese Farmacopee. (Zie foto vorige pagina)

Opzet van een gel-clot-test

De Europese Farmacopee maakt onderscheid tussen de verschillende testmethodieken. Voor de gel-clot-testen gelden andere eisen dan voor de chromogeen-substraat-testen en daarvoor gelden weer andere eisen dan voor de turbidimetrische-testen. Daarnaast geeft de Europese Farmacopee ook aan dat de limit-test de standaardtest is voor validatie van een endotoxinetest, d.w.z. dat bij problemen met andere methodieken de resultaten van de limit-test doorslaggevend zijn.

Wat zijn nu de eisen die de Europese Farmacopee aan de gel-clot-testen stelt; deze eisen gelden dus zowel voor de Limit Test (methodiek A) als ook voor de semi-kwantitatieve-test (methodiek B):

1. validiteit van de test moet vaststaan, d.m.v.;
 - bevestiging van de lysaat-gevoeligheid
 - uitsluiting van storende factoren op de test
2. gelijke volumina van lysaat en monsteroplossing moeten gebruikt worden;
 - meestal is dit 100 µl
3. reactietijd en reactietemperatuur moeten vast staan;
 - in overeenstemming met de opgave van de lysaatproducent
 - meestal een reactietijd van 60 ± 2 minuten en een reactietemperatuur van 37 ± 1°C, zonder trillingen (!)

De belangrijkste eis is de eerste eis, de validiteit van de test. De andere eisen hebben min of meer te maken met de testuitvoering, c.q. de leverancier, die we kiezen.

Het vaststellen van de validiteit van de test moet uitgevoerd worden

bij iedere nieuwe batch lysaat en wanneer er een verandering aan-gebracht wordt in de testuitvoering, die van invloed kan zijn op het uiteindelijke resultaat. De validiteit moet vastgesteld worden m.b.v. een aantal vastgestelde verdunningen, t.w. 2λ, λ, 0,5λ en 0,25λ (λ = gevoeligheid van het gebruikte lysaat).

En er moet een berekening gemaakt worden van de gemiddelde, rekenkundige, eindpuntconcentratie van het lysaat, uitgaande van een standaardserie, in water, in tweevoud of liever nog viervoud. De test is valide als de gevonden gevoeligheid tussen de 0,5λ en de 2λ van de gedeclareerde waarde ligt.

De uitsluiting van storende factoren is een tweede eis betreffende de validiteit van de test. Uitsluitel hierover wordt verkregen door een vergelijkende test uit te voeren met vier verschillende concentraties endotoxinen (2λ, λ, 0,5λ en 0,25λ) in het te testen product t.o.v. eenzelfde test uitgevoerd in water. De productoplossingen moeten in viervoud ingezet worden en de wateroplossingen in tweevoud. Daarnaast moeten er twee negatieve watercontroles en vier negatieve productcontroles meegenomen worden. De test is valide als *alle* negatieve controles negatief zijn en de positieve monsteroplossingen eenzelfde resultaat (in viervoud) geven als de overeenkomstige positieve wateroplossingen (in tweevoud).

In principe moet dit dan ook nog eens uitgevoerd worden met drie verschillende lotnummers lysaat! Al met al een hele boel werk voor het valideren van lysaat en product!

Zoals gezegd hebben wij gekozen voor het uitvoeren van de Limit-Test. Bij het uitvoeren van de Limit-Test moeten we bovenstaande eisen dus ook in ogenschouw nemen en ons rekenschap geven van de consequenties van deze eisen bij de uitvoering van de test.

Wat is nu precies de Limit-Test?

De Limit-Test is de meest eenvoudige

endotoxine-test die uitgevoerd kan worden. Het is *geen* kwantitatieve test maar een kwalitatieve test.

De test zegt alleen iets over de aanwezigheid, c.q. de afwezigheid, van endotoxinen en zegt dus niets over de concentratie aan endotoxinen.

De uitvoering is in principe heel simpel, voor de uitvoering zijn de volgende testoplossingen nodig:

- te testen producten (evt. verdunningen) in tweevoud
- positieve controles in tweevoud
 - te testen producten (evt. verdunningen) met een concentratie van 2λ
 - water met een concentratie van 2λ
- negatieve controle (=water) in tweevoud

Op deze testoplossingen wordt een endotoxine gel-clot-test uitgevoerd en de resultaten zijn valide als de uitslag van de positieve en de negatieve controles voldoen en de te testen producten, in tweevoud, een negatief resultaat te zien geven. Indien één van deze twee productmetingen een positief resultaat te zien geeft dan moet de test herhaald worden, bij twee positieve productresultaten moet het product afgekeurd worden.

Dit is dus een uiterst elegante en snelle endotoxine-test!

Bij het in ogenschouw nemen van deze testuitvoering zien we dat we niet voldoen aan alle eisen die de farmacopee stelt aan een gel-clot-endotoxine-test, m.n. aan de zo belangrijke eerste eis wordt in deze testuitvoering weinig tot geen aandacht gegeven.

Om wel aan deze eis te voldoen moet er dus voor *ieder* lotnummer lysaat een uitgebreid vooronderzoek gedaan worden, voordat we dit kunnen gebruiken voor onze testuitvoering.

Is dit in de praktijk handig?

In onze beleving is dit niet handig. Daarom heb ik gemeend de Limit-Test iets te moeten aanpassen.

Deze aangepaste Limit-Test wordt bij ons op het laboratorium nu een tweetal jaren naar volle tevredenheid toegepast.

Hoe ziet deze test er dan uit?

De aangepaste Limit-Test

Ik vond het belangrijk om in één testuitvoering de validatie van de lysaat-gevoeligheid te kunnen uitvoeren en daarnaast ook iets te kunnen zeggen over de mogelijk aanwezige storende factoren in de te testen producten. Dit wordt, naar mijn idee, gemist in de bovenstaande officiële Limit-Test. Om in één testuitvoering aan zowel de eisen van de Europese Farmacopee als aan de hierboven geformuleerde extra eisen tegemoet te komen, heb ik voorgesteld om de volgende additionele controles voor deze *aangepaste* Limit-Test in te voeren. Twee positieve watercontroles met een concentratie van 2λ en λ (en soms ook $0,5\lambda$, maar dit is een optionele controle) en een endotoxine-controle in product van 2λ . Van het gebruikte water wordt een negatieve controle gemaakt.

De aangepaste Limit-Test bevat dan de volgende testoplossingen; twee positieve (water)controles en een negatieve (water)controle, deze worden beide in tweevoud ingezet, en het te testen product met een positieve productcontrole, deze beide worden in enkelvoud ingezet.

In een schema ziet dat er als volgt uit:

- negatieve controle (water) in tweevoud
- optioneel - positieve controle (water) met een concentratie van $0,5\lambda$, in tweevoud
- positieve controle (water) met een concentratie van λ , in tweevoud
- positieve controle (water) met een concentratie van 2λ , in tweevoud
- te testen product in enkelvoud
- positieve productcontrole met een concentratie van 2λ , in enkelvoud

Een testserie is bij ons valide als de resultaten als volgt zijn:

- > negatieve controle = **negatief**
- > positieve controle = **positief**

Hierbij moet opgemerkt worden dat

gezien de gevoeligheid van de testkit de gelvorming van de positieve controles kan variëren tussen de $0,5\lambda$ en de 2λ .

- > te testen product = **negatief**
- > positieve productcontrole = **positief**



Positief.



Negatief.

In het begin van deze uitvoering hebben we het "te testen product" ook in tweevoud ingezet. We hebben na enige tijd de conclusie getrokken dat we, met een aan zekerheid grenzende betrouwbaarheid, ook met een enkelvoudige analyse toekonden en zodoende is de tweevoudige analyse komen te vervallen (kostenbesparing!).

We hebben het hier wel over

producten die al heel lang door ons op endotoxinen getest worden. Bij nieuwe producten zou het een overweging kunnen zijn om deze gedurende enige tijd in tweevoud in te zetten. Hierdoor wordt een stukje analyse historie opgebouwd die je in het kader van de GMP-z dossiervorming weer nodig hebt.

Interpretatie aangepaste Limit-Test

Negatieve controle:

Het zal duidelijke zijn dat een negatieve controle iets zegt over het gebruikte oplosmiddel (= water). Dit oplosmiddel is gebruikt voor het oplossen van de Controle Standaard Endotoxine, het zgn. CSE, en voor het oplossen van het lysaat. Indien deze negatieve controle een positief resultaat te zien geeft is de rest van de testuitslagen onbetrouwbaar! De conclusie die getrokken kan/moet worden is dat het gebruikte water besmet is geweest met endotoxinen (!?).

Positieve controle:

Er zijn twee positieve watercontroles in iedere testserie. In bijzondere situaties kan er een derde, optionele, watercontrole meegenomen worden. Deze heeft een concentratie van $0,5\lambda$. De eisen m.b.t. de gevoeligheid van de gel-clot-test geven aan dat er gelvorming moet optreden bij een endotoxine concentratie van $0,5\lambda$ tot 2λ (d.w.z. tussen de 50 – 200% t.o.v. de gedeclareerde waarde). Door nu minimaal een tweetal positieve controles met een concentratie van respectievelijk λ en 2λ in de testserie mee te nemen wordt de validatie t.a.v. de gevoeligheid van het lysaat ondervangen (de derde positieve controle, met een concentratie van $0,5\lambda$, zou de reeks completeren). Dit betekent dat de positieve controle met een endotoxine concentratie van 2λ *altijd* moet geleren! De positieve controle met een endotoxine concentratie van λ *mag* geleren, maar dit hoeft niet! Voor de, optionele, derde positieve controle met een endotoxine con-

concentratie van 0,5λ geldt hetzelfde als voor de positieve controle met een endotoxine concentratie van λ, hij *mag* geleren, maar dit hoeft niet! Op deze wijze is, naar mijn idee, de gevoeligheid van het lysaat afdoende vastgesteld, iedere testserie opnieuw.

Te testen product:

Het resultaat van het te testen product *moet* altijd negatief zijn. Indien het resultaat positief is moet de test in *tweevoud* herhaald worden (in een geheel nieuwe testserie!).

Positieve productcontrole:

De positieve productcontrole, met een endotoxine concentratie van 2λ, *moet* altijd positief zijn. Indien het resultaat niet positief is dan wil dat zeggen dat er storende componenten in het product aanwezig zijn die een gelvorming verhinderen. Ook het resultaat van het te testen product, deze zal over het algemeen negatief zijn, moet met de nodige argwaan bekeken worden. Het product mag nu *niet* vrijgegeven worden, een aanvullend onderzoek naar de storende componenten moet uitgevoerd worden volgens een zogenaamde "inhibition and enhancement"-test.

Praktische uitvoering op het laboratorium

Naast deze inhoudelijke kant van de uitvoering van de test heb ik ook gekeken naar de praktische kant van de uitvoering.

Het bleek dat ons waterbad niet voldeed aan de elementaire eis dat de buisjes trillingsvrij kunnen incuberen. Door de aanwezigheid van een roermotor ontstond er nogal wat turbulentie in het water en dat zou de testresultaten zeker negatief beïnvloeden. Door nu een dunwandig klein plastic bakje in het waterbad te plaatsen, met daarin het reageerbuisrekje, wordt de turbulentie rondom de buisjes teniet gedaan, terwijl de temperatuur van het water in het bakje niet noemenswaardig daalt (evt. kan de temperatuur van het waterbad één of twee graden hoger ingesteld worden).

Voor het pipetteren worden gewone pipetpunten gebruikt, speciaal voor deze test houden we echter wel een doos apart. Vooralsnog zie ik niet de noodzaak om speciale steriele pipetpunten aan te schaffen.

Het water dat gebruikt wordt voor het oplossen van het CSE en het lysaat betrekken we van onze eigen apotheek voorraad. Dit is immers gecontroleerd endotoxine-vrij water! De voordelen die het oplossen van het lysaat in bufferoplossing (extern aanschaffen) heeft is evident, maar het is maar de vraag of je dat bij de farmaceutische producten die wij testen echt nodig hebt. Mochten er zich pH-problemen voordoen dan kan het, mijn inziens, altijd nog overwogen worden.

De buisjes voor het maken van de positieve controles en de buisjes voor het uitvoeren van de test betrekken wij van onze leverancier (BioWhittaker). Het zelf "pyrogeen-vrij" maken van buisjes hebben wij wel even overwogen, het is uiteraard "erg" eenvoudig, maar het is maar de vraag hoe je dit proces wil gaan valideren (!). Vandaar dat wij de buisjes gewoon kopen.

Voor de notatie van de testresultaten hebben we een speciaal formulier ontwikkeld, waarop alle relevante gegevens vermeld worden, zowel van alle testkitbestanddelen als van alle te testen producten, zodat achteraf alles te traceren is.

Conclusie

Op deze wijze heb ik op ons laboratorium de "lastige" endotoxinetest om kunnen zetten in een routinematige test, die voldoet aan de nieuwste normen van de Europese Farmacopee en die daarnaast ook nog praktisch (goed) uitvoerbaar is! Vooralsnog zie ik geen reden om een andere dan de (aangepaste) limit-test te gebruiken voor de analyse van onze farmaceutische producten en onze wateranalyses. Ook de hemodialyse vloeistof, hiermee was deze hele testevaluatie immers begonnen, kan met deze test uitstekend geanalyseerd worden. Na een



verdunding van 1:1 met water geeft dit een zeer bruikbare testoplossing.

Afsluiting

Ik hoop met deze artikelenserie een waardevolle aanvulling gegeven te hebben op een routinetest die in ieder farmaceutisch laboratorium wordt uitgevoerd (c.q. thuis hoort). Voor diegenen die interesse hebben in de testuitvoering zoals die bij ons op het laboratorium nu wordt uitgevoerd is er op aanvraag een kopie van onze werkinstructie beschikbaar. Tevens is er voor diegene die interesse hebben in al de berekeningen voor de uitvoering van deze test (zie Extract, jaargang 13, nummer 3, september 2002, pag. 15 e.v.) eveneens een werkinstructie m.b.t. deze berekeningen beschikbaar (incl. EXCEL-werkblad).

Verzoeken graag via email richten aan: brietdijk@alysis.nl.

Verantwoording

Deze testevaluatie was niet mogelijk geweest zonder de bereidwillige medewerking van de firma's BioWhittaker Europe, Pyroquant Diagnostik GmbH en Nodia BV. Ook de discussie(s) met de heren Leo Voll (BioWhittaker Europe) en Robert Porzio (Pyroquant Diagnostik GmbH) hebben bijzonder bijgedragen aan het uiteindelijke resultaat van dit onderzoek.

De collegae van het FarmaToxLab van ziekenhuis Rijnstate hebben met een kritische blik de verschillende conceptteksten doorgelezen en waar nodig aanvullingen en verbeteringen voorgesteld, waarvoor mijn hartelijke dank.