

Markus Weigandt
Dr. sc. hum.

Der Humane Vollblut-Pyrogentest - Optimierung, Validierung und Vergleich mit den Arzneibuchmethoden

Geboren am 11.10.1972 in Püttlingen
Reifeprüfung am 14.5.1991 in Völklingen
Studiengang der Fachrichtung Pharmazie vom WS 1992 bis SS 1996
Erstes Staatsexamen am 30.9.1994 an der Universität Frankfurt/Main
Zweites Staatsexamen am 31.10.1996 an der Universität Frankfurt/Main

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. H.-G. Sonntag

In der vorliegenden Arbeit wurde der Humane Vollblut-Pyrogentest (HVP) weiterentwickelt, mit den Arzneibuchmethoden für die Pyrogentestung, d.h. dem LAL-Test und dem Kaninchenpyrogentest sowie auf seine Tauglichkeit als Routinetest in der Praxis untersucht.

Die erstmalige systematische Validierung des Kaninchenpyrogentest ergab nach Injektion abgestufter LPS-Konzentrationen nur einen geringen Temperaturanstieg, der zudem erst bei vergleichsweise hohen LPS-Konzentrationen auftrat. Die Sensitivität war somit deutlich geringer als beim LAL-Test und HVP. Desweiteren ergab sich eine hohe interindividuelle Schwankungsbreite der Fieberreaktion und insbesondere eine gegenläufige Temperaturreaktion nach Injektion hoher LPS-Dosen. Diese grundsätzlichen Defizite stellen den Kaninchenpyrogentest als "Goldstandard" der Pyrogenprüfung in Frage. Daher wurde auf eine generelle vergleichende Validierung mit dem HVP verzichtet. In stichprobenartigen Vergleichsuntersuchungen konnten bei der gleichzeitigen Überprüfung von 6 mit LPS versetzten Fertigarzneimitteln im Kaninchenpyrogentest und im HVP im ersteren keine Fieberreaktionen erzeugt werden, während der HVP für alle 6 Proben positive Pyrogennachweise erbrachte.

Im Rahmen der Validierung der verschiedenen Komponenten des HVP wurde zunächst der Einfluss des Blutes verschiedenster Blutspender an insgesamt 84 Spendern untersucht. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Eine Ausschüttung von IL-1 β ohne Zugabe von LPS oder anderen Pyrogenen zum Testsystem konnte in keinem Fall bei Verwendung von Blut gesunder Spender nachgewiesen werden. Der HVP reagiert somit spezifisch auf pyrogene Stoffe.
2. Das Alter des Blutspenders hat keinen Einfluss auf das Ergebnis des HVP. Bei Verwendung von Blut erkrankter Spender (Versuche mit Schlaganfallpatienten) konnte in wenigen Fällen auch ohne Stimulierung mit LPS eine IL-1 β -Ausschüttung gezeigt werden. Blut solcher Spender ist daher nicht für den HVP geeignet.
3. Eine Stimulation mit steigenden LPS-Konzentrationen führt im HVP zu einer gleichförmigen Dosis-Wirkungskurve bei der IL-1 β -Ausschüttung, deren Verlauf grob in vier Phasen eingeteilt werden kann. Da für den HVP frisches Vollblut verwendet wird, wurden zur Untersuchung des Einflusses des Blutspenders insgesamt 84 Spender verwendet. Das Blut gesunder Spender schüttet nach LPS-Stimulation in einer vierphasigen Dosis-Wirkungskurve IL-1 β aus. Die durch LPS induzierte absolute Menge an ausgeschüttetem IL-1 β zeigt allerdings sehr starke interindividuelle Unterschiede und verändert sich auch bei demselben Spender im zeitlichen Verlauf.
4. Die Homogenisierung der Reaktionsansätze vor Inkubation erwies sich als entscheidender Optimierungsschritt für den HVP. Die Sensitivität wurde dadurch stark verbessert und die Zahl der notwendigen Paralleluntersuchungen deutlich gesenkt.

5. Mit der Verwendung von *M. terrae* als pyrogenes Stimulans im HVP konnte zum ersten Mal dargestellt werden, dass eine IL-1 β -Ausschüttung auch durch solche Keime induziert werden kann. Die Stimulation wird wahrscheinlich durch die in der Mycobakterienzellwand vorhandenen Lipoarabinomannane ausgelöst.

Auf die Notwendigkeiten einer Arzneibuchmethode eingehend wurden für den HVP ein semiquantitatives und ein quantitatives Verfahren für die Pyrogenprüfung von Arzneimitteln entwickelt. Die Nachweisgrenze für LPS konnte für das semiquantitative Verfahren liegt zwischen 12,5 – 50 pg/ml LPS und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors im Testsystem auf bis zu 1 pg/ml LPS festgelegt werden. Die Empfindlichkeit des LAL-Lysats liegt mit bis zu 3 pg/ml ebenfalls in dieser Größenordnung. Der LPS-Messbereich des quantitativen Verfahrens reicht von 50 – 800 pg/ml LPS, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von 4 – 800 pg/ml LPS.

Beim Einsatz des HVP zur Überprüfung der Pyrogenbelastung von 27 Fertigarzneimitteln wurden verschiedene Arten der Interferenz mit dem HVP festgestellt. Sie reichten von völliger Inhibierung bis zur Verstärkung der IL-1 β -Ausschüttung. Insbesondere über die Verdünnung der Prüfsubstanzen konnte bei allen geprüften Arzneimitteln die Interferenz soweit gesenkt werden, dass die für die Arzneimittelsicherheit wichtigen, mit dem LAL-Test eingeführten Endotoxingrenzwerte mit dem HVP in allen Fällen eingehalten werden konnten. Kein Arzneimittel wurde im HVP falsch positiv oder falsch negativ geprüft und in allen gespeikten Arzneimitteln wurde das LPS richtig wiedergefunden.

Mit der Überprüfung eines Eisenchelatlösers im HVP konnte zum ersten Mal der Nachweis erbracht werden, dass ein im Handel befindliches Fertigarzneimittel Pyrogene enthält, die weder im LAL- noch im Kaninchenpyrogentest, wohl aber mit dem HVP erfaßt werden konnten.

Mit den Untersuchungsergebnissen konnte der Nachweis erbracht werden, dass mit dem HVP ein sensitiver, zuverlässiger und für den Einsatz in der Routine geeigneter Test zum Pyrogennachweis in Arzneimitteln vorliegt, der den beiden Arzneibuchmethoden deutlich überlegen ist. Unter Berücksichtigung der dargestellten Optimierungsparameter sollte er daher als Ersatzmethode für den Kaninchenpyrogentest und als Paralleltest zum LAL-Test umgehend als Arzneibuchmethode anerkannt und angewendet werden.