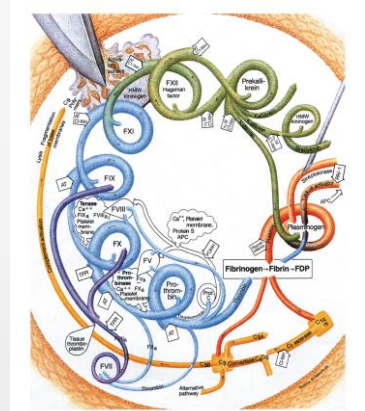


# Haemochrom Diagnostica

Competence in Haemostasis Diagnostics and Endotoxin Analytics

## Endotoxin Detektions Methoden



Haemochrom  
Diagnostica

Haemochrom Diagnostica  
[www.haemochrom.de](http://www.haemochrom.de)  
[info\[at\]haemochrom.de](mailto:info[at]haemochrom.de)  
+49 201 843 770

## Endotoxin Detektions Methoden

### Pharmazeutische Produktion

- » Biopharmazeutika
  - Antikörper, Immunglobuline, Infusionen
  - Impfstoffe, Proteine, Zelltherapie-Produkte
- » Puffer, Rohmaterialien, Wasser
- » Medizinprodukte, Umweltproben
  
- » Kontaminationsquellen
  - Wirkstoffe, Hilfsstoffe, Wasser
  - Primärverpackung
  - Personal



## Endotoxin Detektions Methoden

### Evolution - Messmethoden



Haemotox<sup>®</sup> rFC 2014

### Technologische Entwicklung - Zeit



Rabbit Test 1912

LAL 1977



rFC 2003

EndoLisa 2011

Endozyme 2013

MAT Test 2010



HaemoMAT<sup>®</sup> 2018





## Endotoxin Detektions Methoden

### Testsysteme Überblick

#### Biologische Testsysteme:

- » Kaninchentest (RPT)
- » Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT)

#### Biochemische Testsysteme:

- » Limulus Amoebocyten Lysat Tests (LAL)
  - Gel Clot Test
  - Kinetisch turbidimetrischer Test/turbidimetrischer Endpunkt Test
  - Kinetisch chromogener Test/chromogener Endpunkt Test
- » Rekombinante Faktor C Methoden

## Endotoxin Detektions Methoden

### Biochemische Testsysteme

Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL): EP 2.6.14/USP 85/JP 4.01

“Classical LAL Tests”

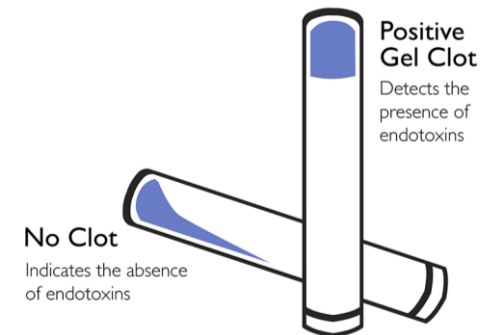
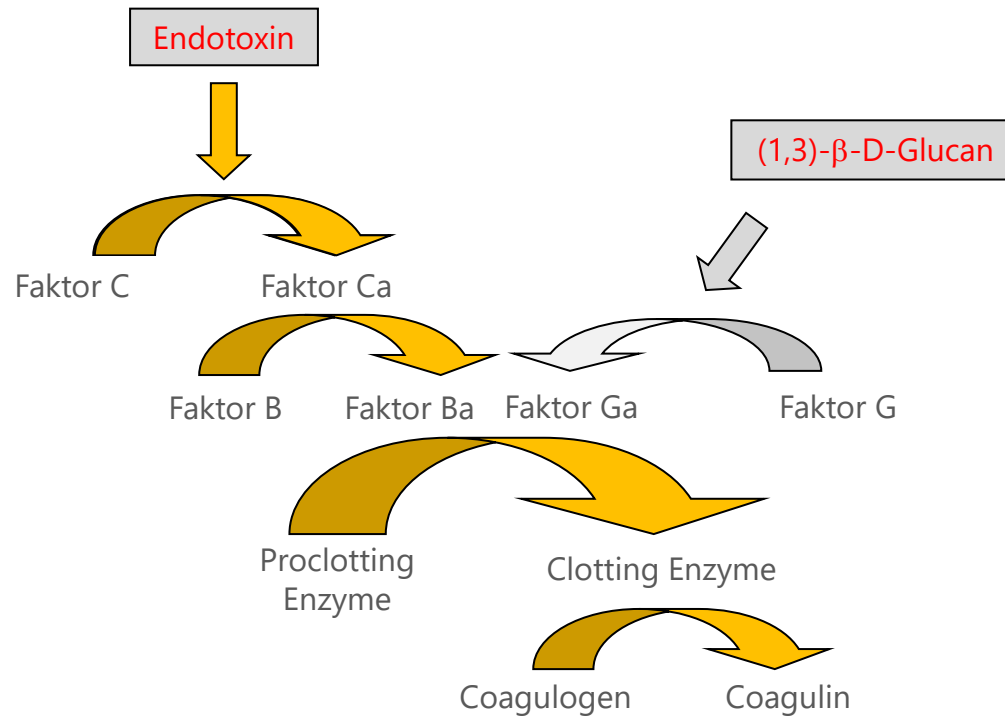
- » Methode A: Gel Clot Limit Test
- » Methode B: Gel Clot (Quantitativer Test)
- » Methode C: Kinetisch Turbidimetrischer Test
- » Methode D: Kinetisch Chromogener Test
- » Methode E: Chromogener Endpunkt Test
- » Methode F: Turbidimetrischer Endpunkt Test



Source: ECA, Flyer for LER Course

## Endotoxin Detektions Methoden

### Reaktionskaskade(Gel Clot)

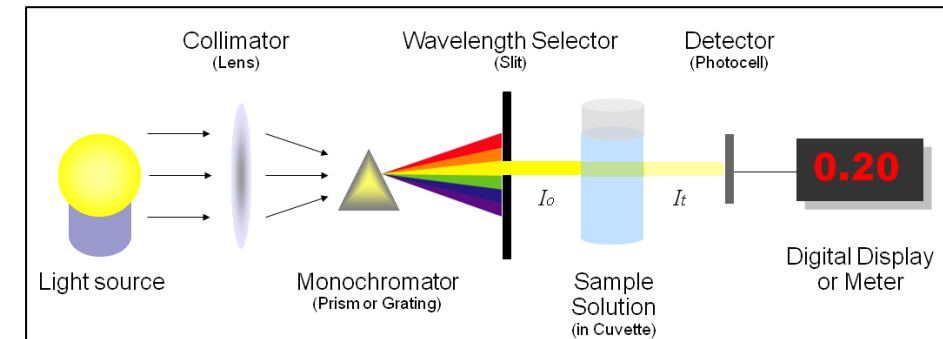
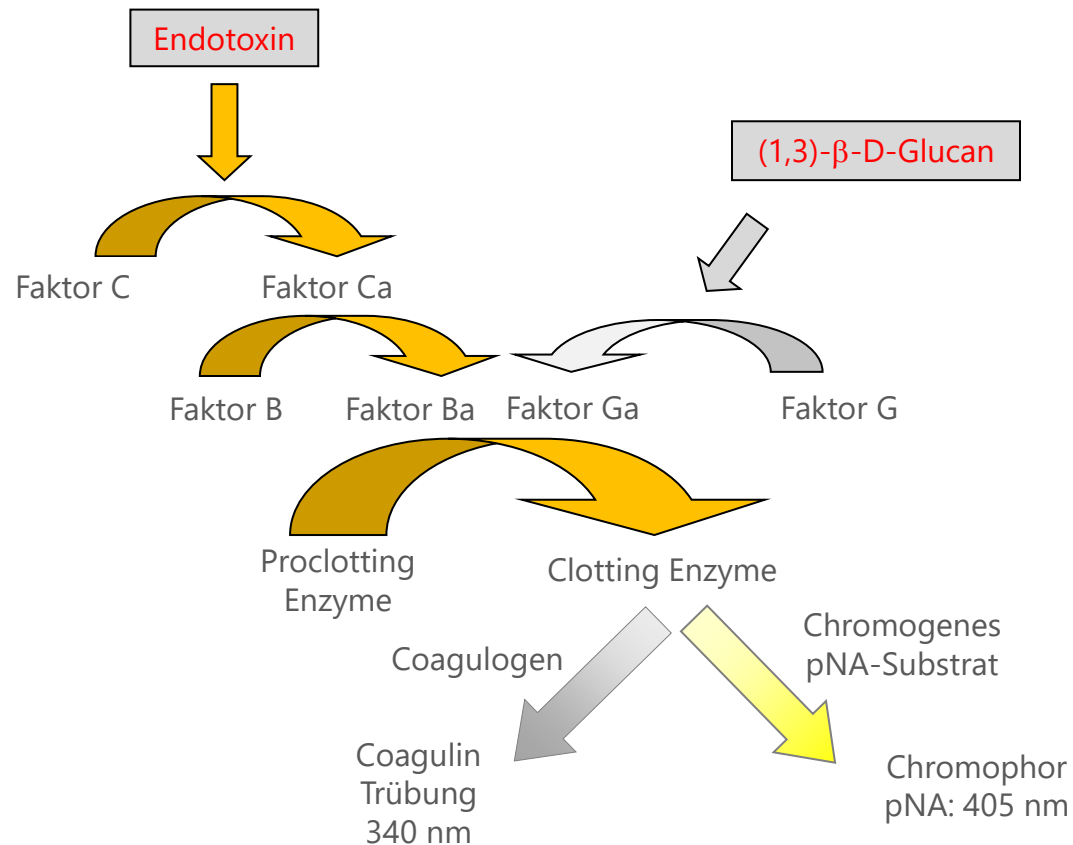


Source: [www.kepleybiosystems.com](http://www.kepleybiosystems.com)



## Endotoxin Detektions Methoden

### Reaktionskaskade (Photometrische Methoden)



Source: [www.edusanjalbiochemist.blogspot.com](http://www.edusanjalbiochemist.blogspot.com)



## Endotoxin Detektions Methoden

### Biochemische Testsysteme

#### LAL-Test Evaluation

- » Methode C und D: Kinetischer Assay
  - » Quantitative Beziehung zwischen Endotoxin Konzentration und Zeit der Onset OD oder
  - » Quantitative Beziehung zwischen Endotoxin Konzentration und Trübungsrate/Farbentwicklung in OD/min
  
- » Methode E und F: Endpunkt Assay
  - » Quantitative Beziehung zwischen Endotoxin Konzentration und Trübung/pNA-Freisetzung am Ende der Inkubationsperiode



## Endotoxin Detektions Methoden

### Biochemische Testsysteme

#### Rekombinante Factor C Methode

- » Nutzung von rekombinantem Faktor C anstelle von LAL
- » Fluorometrische Endpunkt Methode zur Quantifizierung des Endotoxins
  - » Quantitative Beziehung zwischen Endotoxin Konzentration und Fluoreszenz der Reaktionsmischung



©bioMérieux 2019

## Endotoxin Detektions Methoden

### Biochemische Testsysteme

#### Rekombinante Faktor C Methode

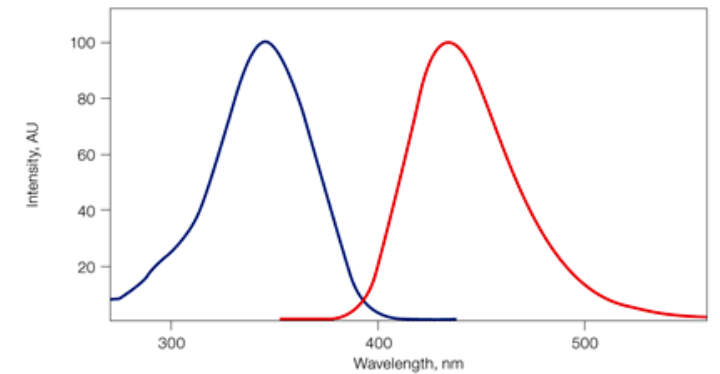
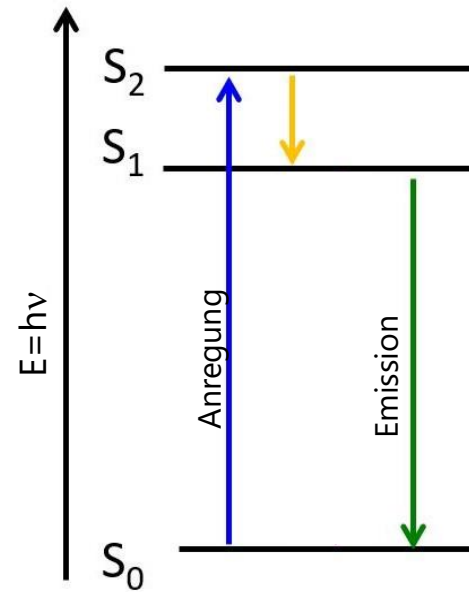
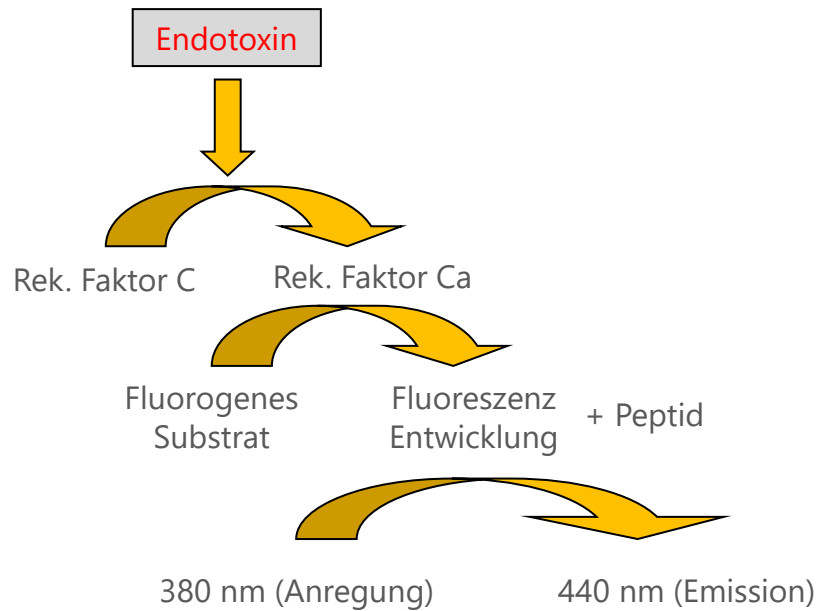
- » EP 2.6.32, „Test for Bacterial Endotoxins using Recombinant Factor C“
  - » Gültig seit 01.01.2021
  - » Veröffentlicht in Ph. Eur. Suppl. 10.3.
- » EP 5.1.10: rFC akzeptiert als alternative Methode seit 2014
- » USP 85: Übernahme der rFC Methode derzeit in Diskussion
- » JP: rFC als alternative Methode: Draft veröffentlicht



©bioMérieux 2019

## Endotoxin Detektions Methoden

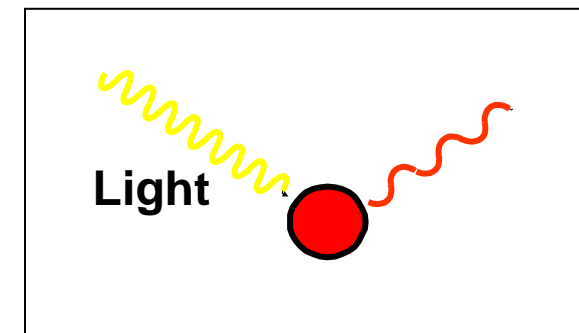
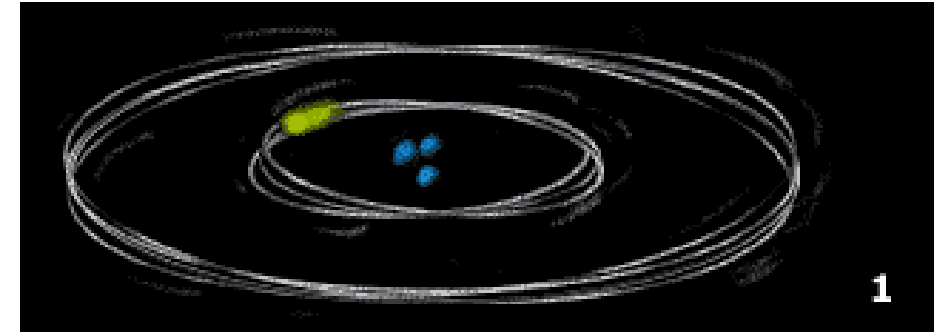
### Reaktionskaskade (rFC Methods)



## Endotoxin Detektions Methoden

### Prinzip der Fluoreszenz

- » Entdeckung 1852 durch George Gabriel Stokes
- » Name leitet sich vom fluoreszierenden Mineral "Fluorit" (Flussspat, Calciumfluorid  $\text{CaF}_2$ )
- » Kurze, spontane Lichtemission
- » Übergang eines angeregten Zustands (durch absorbiertes Licht oder andere elektromagnetische Strahlung) zurück in den energetisch niedrigeren Grundzustand
- » Emittiertes Licht hat weniger Energie als das zuvor absorbierte Licht

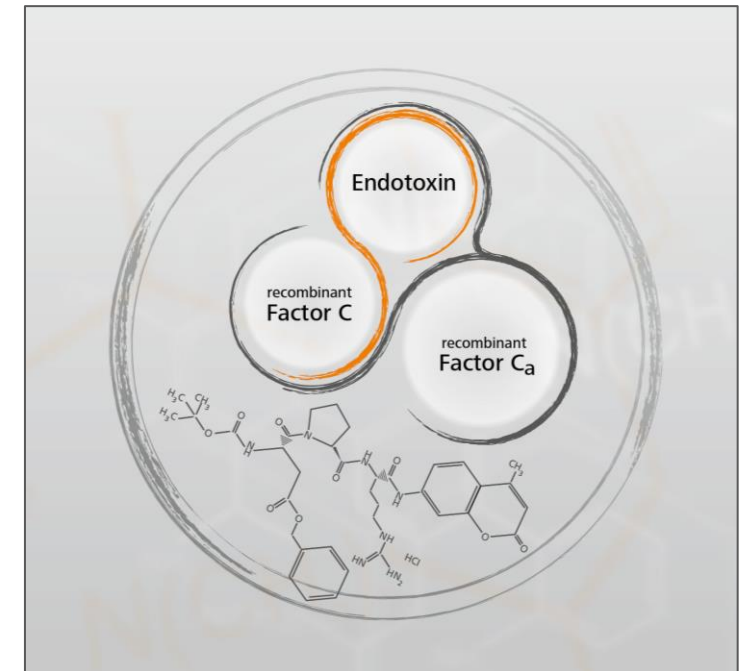


## Endotoxin Detektions Methoden

### Biochemische Testsysteme

#### Rekombinanter Faktor C Test

- » Homogener Endpunkt Assay für die quantitative Bestimmung von Endotoxinen (LPS)
- » Endotoxin-Rezeptor: rekombinanter Faktor C (rFC) anstelle von Faktor C aus dem Pfeilschwanzkrebs
- » Aktiviertes Enzym (rFCa) spaltet direkt fluorogenes Substrat
  - » Keine Signalverstärkung durch Zwischenschritte (Signalverstärkung erfolgt durch das Fluoreszenz-Messgerät)
  - » Faktor B, Proclotting Enzyme and Coagulogensind nicht vorhanden (Keine Interferenz durch  $\beta$ -D-Glukane)

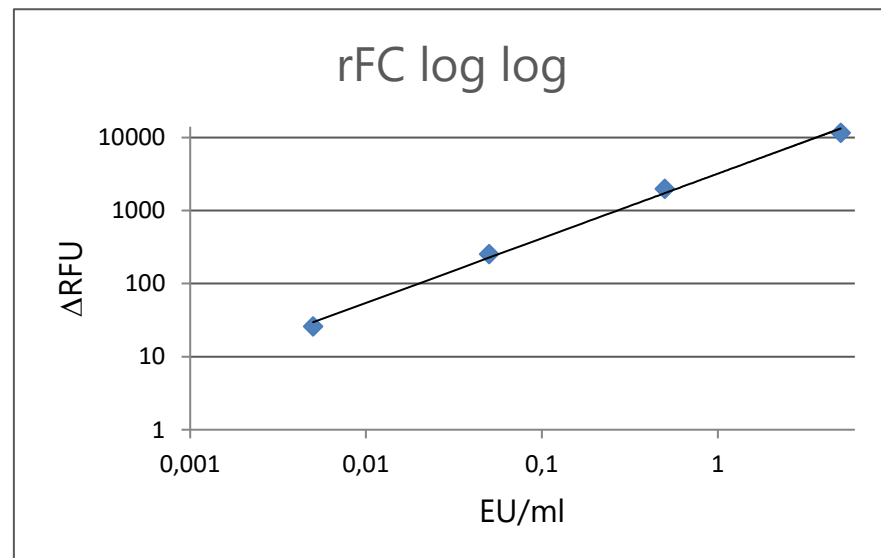


## Endotoxin Detektions Methoden

### Biochemische Testsysteme

#### Rekombinanter Faktor C Test

#### Standard Kurve (rFC)



Regulatorische Anforderung:  $r \geq 0,980$

rFC Endpunkt	
EU/ml	ΔRFU
0,005	26
0,05	255
0,5	1.994
5	11.617

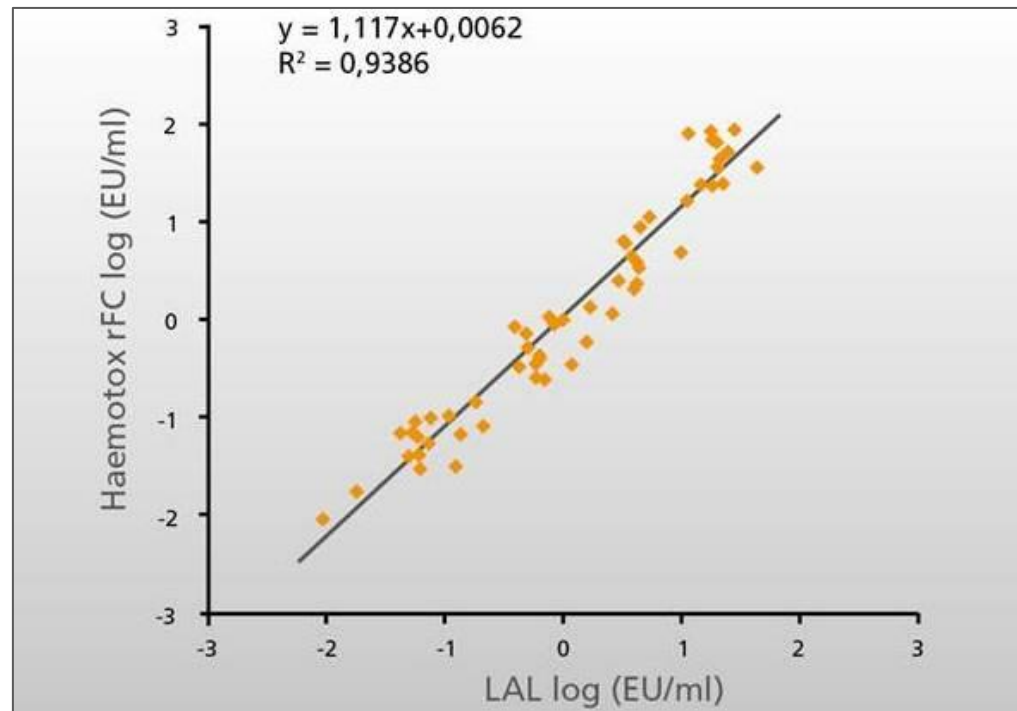




## Endotoxin Detektions Methoden

### Biochemical Test System

#### Vergleich LAL - rFC



Ph. Eur. 2.6.32:

„As factor G is absent from the test kit, false positive  $\beta$ -Glucan activation is not possible. This must be taken into account when the method is compared to other bacterial endotoxin quantification methods.“



## Endotoxin Detektions Methoden

### Conclusio

- » Endotoxin ist Parameter für In-Process Control (IPC) und Freigabetestung
- » Verschiedene LAL Methoden sind verfügbar und akzeptiert durch die regulatorischen Behörden (EP 2.6.14/USP 85/JP 4.01)
- » Rekombinante Faktor C Methode: Kapitel 2.6.32 ist übernommen in die Ph. Eur.
- » USP 85: Übernahme der rFC Methode derzeit in Diskussion
- » JP: rFC als alternative Methode: Draft veröffentlicht
- » Faktor C ist Biosensor für LPS/Endotoxin Detektion in allen Methoden

