



## Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Kinetic-QCL™

US-Lizenz Nr. 1775. Übersetzte Versionen sind unter [www.lonza.com](http://www.lonza.com) verfügbar

# Inhalt

Abschnitt	Seite	
1	Verwendungszweck	2
1	Warnhinweise	2
1	Erläuterung des Tests	3
2	Reaktionsmechanismus	4
2	Mitgelieferte Reagenzien und Lagerungsbedingungen	5
3	Nicht mitgelieferte Materialien und Geräte	6
4	Probennahme und Probenvorbereitung	8
4	Arten von Kinetic-QCL™ Assays	9
5	Vorbereitung der Reagenzien	11
6	Testdurchführung	14

Abschnitt		Seite
7	Qualitätskriterien für den Test	16
7	Berechnung der Endotoxinkonzentration	17
8	POWERCURVE™	20
9	Hemmung des Tests durch die Probe	22
9	Einschränkungen und Hinweise	25
9	Farbige Proben	25
10	Archivierte Standardkurve	26
10	Korrelation mit anderen Methoden	27
10	Hinweis für unsere internationalen Kunden	27
11	Quellenangabe	28

**Wichtig: Lesen Sie vor der Durchführung des Tests die gesamte Broschüre**

## Verwendungszweck

Dieses Produkt ist für die Verwendung als *in-vitro* Endprodukt-Endotoxintest für menschliche und tierische Parenteralia, biologische Produkte und medizinische Geräte bestimmt. Dieses Produkt ist nicht für den Nachweis von Endotoxin in klinischen Proben oder als Hilfsmittel bei der Diagnose einer menschlichen Erkrankung bestimmt. Bei diesem Test wird zur photometrischen Bestimmung der Endotoxinkonzentration Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) sowie ein inkubierender Absorptionsreader für Mikrotiterplatten und die entsprechende Software verwendet.

In der Pharmakopöe sind die erforderlichen Verfahren aufgeführt zur:

1. Festlegung von Endotoxingrenzwerten für Arzneimittel und medizinische Geräte
2. Validierung der Verwendung von LAL als Endprodukt-Endotoxintest
3. Entwicklung eines Protokolls für Routinetests<sup>8</sup>

Die hier beschriebenen Verfahren basieren auf den Richtlinien der Pharmakopöe.

## Warnhinweise

Nur für *In-Vitro*-Endotoxinbestimmung. Der Kinetic-QCL™ Assay ist nicht für die Erkennung einer Endotoxämie bei Menschen geeignet. Der LAL-Test kann den Kaninchen-Pyrogentest nach USP ersetzen, sofern er gemäß den Richtlinien der Pharmakopöe für Endprodukt-Endotoxintests für menschliche und tierische Parenteralia, biologische Produkte und medizinische Geräte verwendet wird<sup>8</sup>.

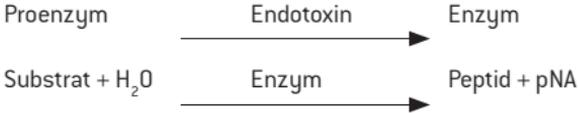
## Erläuterung des Tests

Kinetic-QCL™ ist ein quantitativer, kinetischer Assay zum Nachweis von Endotoxin aus Gram-negativen Bakterien. Eine Probe wird mit dem LAL/Substrat-Reagenz vermischt, in einem Absorptionsreader für Mikrotiterplatten inkubiert und automatisch daraufhin überwacht, nach welcher Zeit eine gelbe Färbung zu erkennen ist. Die Zeit, bis diese gelbe Färbung zu erkennen ist (Reaktionszeit), ist umgekehrt proportional zur Menge des vorhandenen Endotoxins. Das bedeutet: bei Vorhandensein einer großen Menge an Endotoxin verläuft die Reaktion schneller, bei einer geringen Menge an Endotoxin ist die Reaktionszeit länger. Die Endotoxinkonzentration in unbekanntenen Proben lässt sich mit Hilfe einer Standardkurve berechnen.

Die Verwendung von LAL zum Nachweis von Endotoxin ist auf eine Beobachtung von Bang<sup>1</sup> zurückzuführen. Er stellte fest, dass eine Infektion des Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) mit Gram-negativen Bakterien eine tödliche intravasale Gerinnung zur Folge hat. Levin und Bang<sup>2,3</sup> zeigten später, dass diese Gerinnung das Ergebnis einer Reaktion zwischen Endotoxin und einem gerinnbaren Protein in den zirkulierenden Amöbozyten des Limulus ist. Nach der Entwicklung eines gerinnungshemmenden Mittels für Limulus-Blut stellten Levin und Bang<sup>4</sup> ein Lysat aus gewaschenen Amöbozyten her, das ein außergewöhnlich empfindlicher Indikator für das Vorhandensein von Endotoxin war. Solum<sup>5,6</sup> und Young, Levin, und Prendergast<sup>7</sup> haben das gerinnbare Protein aus LAL aufgereinigt und beschrieben, und sie haben gezeigt, dass die Reaktion mit Endotoxin enzymatischer Natur ist.

Die vorliegende LAL-Methode nutzt den ersten Teil der LAL-Endotoxin-Reaktion, um ein Enzym zu aktivieren, das wiederum p-Nitroanilin (pNA) aus einem synthetischen Substrat freisetzt und dabei eine gelbe Färbung erzeugt.

## Reaktionsmechanismus



Endotoxin aus Gram-negativen Bakterien katalysiert die Aktivierung eines Proenzym im LAL<sup>7</sup>. Die Anfangsgeschwindigkeit der Aktivierung wird durch die vorhandene Endotoxinkonzentration bestimmt. Das aktivierte Enzym katalysiert die Freisetzung von pNA aus dem farblosen Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. Das freie pNA wird während des Inkubationszeitraums kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen. Die Endotoxinkonzentration in einer Probe wird aus ihrer Reaktionszeit im Vergleich zu einer Standardkurve berechnet.

## Mittelieferte Reagenzien und Lagerungsbedingungen

### Kinetic-QCL™ Reagenz (K50-643) Gelb markiertes Fläschchen

Jedes Fläschchen enthält eine lyophilisierte Mischung aus Lysat, hergestellt aus den zirkulierenden Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*), und chromogenem Substrat.

**Unmittelbar vor Gebrauch mit 2,6 ml LAL-Reagenz-Wasser pro Fläschchen rekonstituieren.** Sind mehrere Fläschchen erforderlich, vor Gebrauch den Inhalt von zwei oder mehreren Fläschchen vereinigen. Durch behutsames Schwenken mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Gefriergetrocknetes Kinetic-QCL™ Reagenz bei 2–8 °C lagern. Vor längerer Lichteinwirkung schützen.

Rekonstituiertes Kinetic-QCL™ Reagenz sollte sofort aufgebraucht werden. Rekonstituiertes Kinetic-QCL™ Reagenz ist bei 2–8 °C für 8 Stunden stabil und kann bei unter -10 °C bis zu zwei Wochen gelagert werden. Nur einmal einfrieren und auftauen.

### *E. coli* 055:B5 Endotoxin (E50-643) Rot markiertes Fläschchen

Das Rekonstitutionsvolumen des Endotoxins ist auf dem Analysenzertifikat (CoA) angegeben und ist so berechnet, dass es eine Lösung mit 50 EU (oder IE)/ml ergibt. Mit dem angegebenen Volumen LAL-Reagenz-Wasser rekonstituieren. Mindestens 15 Minuten bei hoher Drehzahl auf einem Vortex-Mischer kräftig schütteln. Vor weiterer Verwendung muss eine bereits rekonstituierte und gelagerte Stammlösung auf Raumtemperatur erwärmt und 15 Minuten bei hoher Drehzahl auf einem Vortex-Mischer kräftig geschüttelt werden. Dies ist wichtig, da das Endotoxin dazu neigt, am Glas anzuhafte. Das CoA steht unter [www.lonza.com/coa](http://www.lonza.com/coa) zur Verfügung.

Lyophilisiertes *E. coli* 055:B5 Endotoxin muss bei 2–8 °C gelagert werden. Die rekonstituierte Endotoxinstammmlösung ist bei 2–8 °C vier Wochen stabil. **Hinweis:** In einigen Kitformaten (nur Lysat) ist Endotoxin nicht enthalten, allerdings erforderlich.

Dieses Endotoxin wird dem Anwender der Einfachheit halber zur Verfügung gestellt. Zur Vorbereitung der Standards können auch andere Endotoxinpräparate verwendet werden; es muss jedoch deren Wirkstärke im chromogenen Assay im Verhältnis zum Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) bestimmt werden.

### LAL-Reagenz-Wasser (W50-640) **Gelb markierte Flasche**

Jede Flasche enthält 30 ml LAL-Reagenz-Wasser. Dieses Wasser sollte zum Lösen des Kinetic-QCL™ Reagenz und *E. coli*-Endotoxins sowie zur Vorbereitung der Endotoxin- und Probenverdünnungen verwendet werden. LAL-Reagenz-Wasser entspricht Wasser für den Test auf bakterielle Endotoxine (BET).

LAL-Reagenz-Wasser muss bei 2–8 °C gelagert werden.

**Hinweis:** In einigen Kitformaten (nur Lysat) ist LAL-Reagenz-Wasser nicht enthalten, allerdings erforderlich.

### **Nicht mitgelieferte Materialien und Geräte**

1. Endotoxinfreie Einweg-Glasröhrchen (13 × 100 mm, #N207 oder gleichwertig).
2. Einzeln verpackte serologische Pipetten.
3. Automatische Pipetten mit endotoxinfreien, einzeln verpackten oder in Boxen gepackten Spitzen.

4. Endotoxinfreien Einweg-Mikrotiterplatten.  
**Hinweis:** Vor routinemäßigem Gebrauch sollten die Mikrotiterplatten vorqualifiziert werden<sup>8</sup> (#25-340 oder gleichwertig).
5. Reagenzreservoir (#00190035 oder gleichwertig).
6. Achtkanalpipette.
7. Natriumhydroxid, 0,1 N, oder Salzsäure, 0,1 N, aufgelöst in LAL-Reagenz-Wasser, für pH-Einstellung der Probe, sofern erforderlich.
8. Absorptionsreader für Mikrotiterplatten, mit Inkubationsfunktion (ELx808™ IU-Reader, #25-315S oder gleichwertig).
9. WinKQCL™ Software.
10. Timer.
11. Vortex-Mischer.
12. Für Kits ohne Wasser: LAL-Reagenz-Wasser (#W50-640, #W50-100, #W50-500 oder gleichwertig).
13. Endotoxinstandard (Kontroll-Standard-Endotoxin, das zu der LAL-Charge passt).

## Probennahme und Probenvorbereitung

Zur Vermeidung einer Verunreinigung mit Mikroorganismen oder Endotoxinen muss sorgfältig gearbeitet werden. Alle mit der Probe oder den Testreagenzien in Kontakt kommenden Materialien müssen endotoxinfrei sein. Saubere Laborglaswaren und Materialien können durch eine Erhitzung auf 250 °C für 30 Minuten von Endotoxinverunreinigungen befreit werden. Es sind geeignete Vorkehrungen zum Schutz der pyrogenfreien Materialien vor nachfolgenden umweltbedingten Verunreinigungen zu treffen.

Erfahrungsgemäß sind die meisten sterilen, einzeln verpackten Pipetten und Pipettenspitzen aus Kunststoff endotoxinfrei. Diese Materialien sollten jedoch vor ihrer regelmäßigen Verwendung entsprechend getestet werden.

Es kann erforderlich sein, den pH-Wert der Probe mit endotoxinfreiem Natriumhydroxid oder Salzsäure auf einen Wert zwischen 6,0 und 8,0 einzustellen. Den pH-Wert immer in einem Aliquot der Gesamtprobe messen, um eine Verunreinigung durch die pH-Elektrode zu vermeiden. Den pH-Wert nicht in ungepufferten Lösungen einstellen.

Zu testende Proben sind so zu lagern, dass jegliche bakterielle Aktivität gestoppt ist, anderenfalls kann sich der Endotoxingehalt im Lauf der Zeit erhöhen. Proben dafür zum Beispiel bei Lagerzeiten unter 24 Stunden bei 2–8 °C aufbewahren und bei Lagerzeiten über 24 Stunden einfrieren. Der Endanwender ist für die Validierung von geeignetem Behälter und Lagerbedingungen seiner Proben verantwortlich.

Wenn der Behälter mit dem Verdünnungsmittel zur Rehydrierung des Kinetic-QCL™ Reagenz zuvor geöffnet worden war oder nicht von Lonza geliefert wurde, muss auch das Verdünnungsmittel selbst auf eine Verunreinigung mit Endotoxin getestet werden.

## Arten von Kinetic-QCL™ Assays

Der inkubierende Absorptionsreader für Mikrotiterplatten und die WinKQCL™ Software sind integraler Bestandteil des Kinetic-QCL™ Assays. Es ist wichtig, sich mit dem Betrieb des Readers und den Funktionen der WinKQCL™ Software vertraut zu machen. In den Handbüchern oder der Hilfe finden sich weiterführende Informationen zum Reader und zur WinKQCL™ Software.

Es gibt vier (4) grundlegende Arten von Kinetic-QCL™ Assays, die jeweils für spezifische Aspekte eines LAL-Tests eingesetzt werden.

### 1. Routine

Beim Routinetest wird die Endotoxinkonzentration einer unbekannt Probe berechnet, indem die Ergebnisse der Probe mit den Ergebnissen einer Endotoxinstandardreihe verglichen werden.

Als Bestandteil eines Routine-Assays hat der Anwender die Möglichkeit, eine Positive Produktkontrolle (PPC) zur Beurteilung von Hemmung oder Verstärkung in einem Produkt (Abschnitt 2 unten) hinzuzufügen. Eine PPC ist eine Produktprobe, der eine bekannte Menge Endotoxin zugesetzt wurde. Die WinKQCL™ Software berechnet automatisch die Menge des in der PPC wiedergefundenen Endotoxins und ermöglicht dadurch einen Vergleich mit der ursprünglich zugegeben Endotoxinmenge.

### 2. Hemmung/Verstärkung

Die LAL-Reaktion ist enzymvermittelt und verfügt damit über einen optimalen pH-Bereich sowie spezifische Anforderungen an Salz und zweiwertige Kationen. Gelegentlich können Proben diese optimalen Bedingungen soweit verändern, dass das Lysat gegenüber Endotoxin unempfindlich wird. Negative Ergebnisse in Proben, die den LAL-Test hemmen, bedeuten nicht notwendigerweise, dass kein Endotoxin vorhanden ist.

Ein Hemmungs-/Verstärkungs-Assay dient dazu, den Grad der Produktverdünnung zu bestimmen, bei dem die Hemmung oder Verstärkung überwunden wird. Jede Produktverdünnung muss von einer Positiven Produktkontrolle (PPC) begleitet werden. Die WinKQCL™ Software berechnet automatisch die Menge des in der PPC wiedergefundenen Endotoxins und vergleicht diese mit der ursprünglich zugegeben Endotoxinmenge. Auf diese Weise kann bestimmt werden, welche Produktverdünnungen nicht störend wirken.

### 3. RSE/CSE

Ein RSE/CSE-Assay dient zur Bestimmung der Wirkstärke eines Kontroll-Standard-Endotoxins (CSE) in Bezug auf die Konzentrationseinheiten des Referenz-Standard-Endotoxins (RSE).

Der Assay erfordert eine einzelne RSE-Verdünnungsreihe und mindestens einen Satz von Verdünnungen des CSE. Je nach Konzentrationseinheiten des CSE berechnet die WinKQCL™ Software automatisch die mittlere Wirkstärke in EU/ng oder EU/ml. Der Anwender kann zudem auch andere Einheiten als EU oder ng eingeben.

#### 4. Initiale Qualifizierung

Ein Initialer Qualifizierungstest entspricht den in der Pharmakopöe beschriebenen Anforderungen<sup>8</sup>. **Dieser Assay ist ein erforderlicher Bestandteil der Validierung des LAL-Assays und muss zudem für jede neue Charge von Kinetic-QCL™ durchgeführt werden.**

Der Initiale Qualifizierungstest berechnet für jedes Replikat eines jeden Endotoxinstandards eine doppellogarithmische lineare Korrelation der einzelnen Reaktionszeiten. Die anderen Assays nutzen die durchschnittlichen Reaktionszeiten aller Replikate jedes Standards.

Im Initialen Qualifizierungstest können keine Proben mitgemessen werden.

### Reagenzienvorbereitung

Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

Um die Endotoxinkonzentrationen in unbekanntem Proben zu berechnen, muss jeder Kinetic-QCL™ Test mit einer gültigen Standardkurve verknüpft werden.

Aufgrund des großen Konzentrationsbereichs, innerhalb dessen Endotoxinwerte bestimmt werden können, ist es möglich, den quantitativen Bereich eines gegebenen Tests einzustellen, indem man die Konzentration der zur Erstellung der Standardkurve verwendeten Endotoxinstandards anpasst. Es sind mindestens drei Standards erforderlich.

Der Kinetic-QCL™ Assay wurde so optimiert, dass er zwischen 0,005 EU/ml und 50,0 EU/ml linear ist. Der einzelne Anwender kann jedoch abhängig von den spezifischen Anforderungen die Standardkurve auch kürzen. Vorhandene Daten deuten darauf hin, dass die Kürzung der Standardkurve eines kinetisch-chromogenen LAL- Tests die Genauigkeit der berechneten Endotoxinwerte in den Proben erhöhen kann. Anwendern wird empfohlen, sich mit den Anforderungen der Pharmakopöe für kinetische LAL-Methoden vertraut zu machen, bevor sie einen Bereich für die kinetisch-chromogene LAL-Standardkurve festlegen, der für Routinetests von Produktproben verwendet werden soll<sup>8</sup>.

In nachfolgender Tabelle wird ein Verdünnungsschema für die Herstellung einer Endotoxinverdünnungsreihe aus dem im Kit mitgelieferten Endotoxin vorgeschlagen. Nicht alle Verdünnungen müssen für die Erstellung einer Standardkurve verwendet werden. Alternative Verdünnungsschemata können genauso verwendet werden wie andere, nicht in diesem Kit mitgelieferte Endotoxine. Wenn das verwendete Endotoxin nicht im Kit mitgeliefert wurde, kann ein RSE/CSE-Test zur Bestimmung der CSE-Wirkstärke erforderlich sein.

**Hinweis:** Zum Ansetzen der Endotoxinverdünnungen keine Kunststoffröhrchen verwenden.

Endotoxin-Konzentration (EU/ml)	Volumen des LAL-Reagenz-Wassers	Volumen des dem LAL-Reagenz-Wasser hinzugefügten Endotoxins
5,0	0,9 ml	0,1 ml einer Lösung mit 50,0 EU/ml
0,5	0,9 ml	0,1 ml einer Lösung mit 5,0 EU/ml
0,05	0,9 ml	0,1 ml einer Lösung mit 0,5 EU/ml
0,005	0,9 ml	0,1 ml einer Lösung mit 0,05 EU/ml

1. Eine Lösung mit 5,0 EU/ml Endotoxin ansetzen. Dafür 0,1 ml der 50,0 EU/ml Endotoxinstammlösung zu 0,9 ml LAL-Reagenz-Wasser in einen passenden Behälter geben und mit 5,0 EU/ml kennzeichnen. Diese Lösung sollte vor weiterem Gebrauch mindestens 1 Minute auf einem Vortex-Mischer bei hoher Drehzahl kräftig geschüttelt werden.
2. 0,1 ml der 5,0 EU/ml Endotoxinlösung zu 0,9 ml LAL-Reagenz-Wasser in einen passenden Behälter geben und diesen mit 0,5 EU/ml kennzeichnen. Die Lösung sollte vor weiterem Gebrauch mindestens 1 Minute auf einem Vortex-Mischer bei hoher Drehzahl kräftig geschüttelt werden.
3. 0,1 ml der 0,5 EU/ml Endotoxinlösung zu 0,9 ml LAL-Reagenz-Wasser in einen passenden Behälter geben und diesen mit 0,05 EU/ml kennzeichnen. Diese Lösung sollte vor weiterem Gebrauch mindestens 1 Minute auf einem Vortex-Mischer bei hoher Drehzahl kräftig geschüttelt werden.
4. 0,1 ml der 0,05 EU/ml Endotoxinlösung zu 0,9 ml LAL-Reagenz-Wasser in einen passenden Behälter geben und diesen mit 0,005 EU/ml kennzeichnen. Diese Lösung sollte vor weiterem Gebrauch mindestens 1 Minute auf einem Vortex-Mischer bei hoher Drehzahl kräftig geschüttelt werden.

## Testdurchführung

In den Handbüchern zum Reader und zur WinKQCL™ Software finden sich weiterführende Informationen zur Durchführung eines Kinetic-QCL™ Tests.

1. Eine spezifische **Vorlage** für den auszuführenden Test erstellen. Eine Vorlage enthält den Namen des Analysten, die Art des Assays, die Chargennummern der Reagenzien, die Anzahl und Konzentration der Endotoxinstandards, die Anzahl der Replikate und Informationen zur Platzierung der Standards und Proben auf der Mikrotiterplatte.
2. Für die **Methode** muss **Kinetic-QCL** ausgewählt werden. Die folgenden Standardeinstellungen der Vorlage sollten nicht ohne vorherige Qualifizierung geändert werden:

Delta t (Sekunden)	150
Messfilter (nm)	405
Delta mOD	200
Anzahl der Zyklen	40

3. Die Vorlage ausdrucken und als Pipettierhilfe zur Platzierung der Standards und Proben auf einer Mikrotiterplatte verwenden.
4. Die Vorlage unter Befolgung der Eingabeaufforderungen der WinKQCL™ Software „Starten“.

5. Vorsichtig 100 µl der LAL-Reagenz-Wasser-Negativkontrolle, Endotoxinstandards, Produktproben, Positiven Produktkontrollen (siehe Seiten 22–24 bezüglich Anweisungen zur Positiven Produktkontrolle) usw. in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte pipettieren.
6. Die gefüllte Platte im Reader platzieren und den Deckel schließen.
7. Die Platte für  $\geq 10$  Minuten bei  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  vorinkubieren.
8. Gegen Ende der Vorinkubationszeit jedes der benötigten Kinetic-QCL™ Reagenzfläschchen mit 2,6 ml LAL-Reagenz-Wasser pro Fläschchen rekonstituieren. Vorsichtig, aber vollständig mischen.  
**Hinweis:** Das Lysat nicht auf einem Vortex-Mischer schütteln.
9. Die Reagenzien in einem Reagenzreservoir vereinigen und durch Hin- und Herschwenken des Reservoirs vorsichtig mischen.
10. Mit einer Achtkanalpipette jeweils 100 µl des Kinetic-QCL™ Reagenz in alle Wells der Mikrotiterplatte zugeben, dabei mit der ersten Spalte (A1-H1) beginnen und der Reihe nach bis zur letzten verwendeten Spalte fortfahren. Reagenz so schnell wie möglich hinzugeben.  
**Hinweis:** Blasenbildung vermeiden!
11. Sofort auf die Schaltfläche „OK“ in der WinKQCL™ Software klicken, um den Test zu starten.  
**Hinweis:** Bei der Durchführung des Kinetic-QCL™ Assays bleibt der Deckel der Mikrotiterplatte abgenommen.

## Qualitätskriterien für den Test

### Linearität

Die Linearität der Standardkurve innerhalb des für die Endotoxinbestimmung verwendeten Konzentrationsbereichs sollte überprüft werden. Dafür sollten entsprechend der Parameter eines **Initialen Qualifizierungstests** nicht weniger als drei Endotoxinstandards, die den gewünschten Konzentrationsbereich abdecken, und eine LAL-Reagenz-Wasser-Negativkontrolle untersucht werden. Der Test sollte mindestens in Dreifachbestimmung erfolgen. Für jede zusätzliche Logstufe sollten zusätzliche Standards hinzugefügt werden, um den gesamten Bereich der Standardkurve abzudecken.

Der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) der berechneten Standardkurve sollte  $\geq 0,980$  betragen.

### Reproduzierbarkeit von Ergebnissen

Proben sollten in Mehrfachbestimmung untersucht werden, um zu zeigen, dass sorgfältig gearbeitet wurde und der Variationskoeffizient niedrig ist. Der Variationskoeffizient (VK) entspricht der Standardabweichung der Reaktionszeiten der Probe, geteilt durch den Mittelwert, und wird in der Regel in Prozent ausgedrückt. Der Variationskoeffizient der Reaktionszeiten für die Replikate sollte unter 10 % liegen. Erfahrungsgemäß sind Werte von 3–4 % erreichbar.

## Berechnung der Endotoxinkonzentration

Der Reader/die WinKQCL™ Software überwacht während des gesamten Tests die Absorption bei 405 nm in jedem Well der Mikrotiterplatte. Der erste Messwert der Absorption in jedem Well dient als Basislinie. Mit deren Hilfe bestimmt der Reader die Zeit, die erforderlich ist, bis die Absorption um 0,200 Absorptionseinheiten gestiegen ist. Diese Zeit wird Reaktionszeit genannt. Die WinKQCL™ Software führt automatisch eine doppellogarithmische lineare Korrelation der **Reaktionszeit** jedes Standards und der damit korrespondierenden Endotoxinkonzentration durch. Diese Standardkurvenparameter sind auf dem Ausdruck des Berichts aufgeführt. Wenn der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten ( $r$ )  $\geq 0,980$  beträgt, kann der Anwender ein polynomiales Modell zur Erstellung einer Standardkurve verwenden und damit Endotoxinkonzentrationen der Proben berechnen. Dieses polynomiale Regressionsmodell (POWERCURVE™) ist eine wichtige Funktion der WinKQCL™ Software (siehe POWERCURVE™, Seite 20).

### Lineare Regression

Das folgende Beispiel zeigt, wie die WinKQCL™ Software die doppellogarithmische lineare Korrelation durchführt und die Endotoxinkonzentration in unbekanntenen Proben berechnet. Es ist nicht erforderlich, diese Berechnungen unabhängig durchzuführen. Für jede Probe jedes Produkts berechnet die WinKQCL™ Software aus der Reaktionszeit dieser Probe die entsprechende Endotoxinkonzentration. Die Software passt automatisch die **Endergebnisse des Tests** an, um Produktverdünnungen einzubeziehen.

## Lineare Korrelation

### Beispielberechnungen

Standards	Konzentration	Durchschnittliche Reaktionszeit (Sekunden)	Log Konzentration	Log durchschnittliche Reaktionszeit
Negativkontrolle	—	Nicht reagiert	—	—
S1	0,005 EU/ml	4351	-2,30103000	3,63858908
S2	0,05 EU/ml	2496	-1,30103000	3,39724458
S3	0,5 EU/ml	1406	-0,30103000	3,14798532
S4	5,0 EU/ml	895	0,69897000	2,95182304
S5	50,0 EU/ml	561	1,69897000	2,74896286
Proben				
1	—	1576	—	3,19755621
2	—	943	—	2,97451169

$$\text{Steigung} = \left( \frac{S_y}{S_x} \right) r$$

$$Y\text{-Achsenabschnitt} = \sum y / N - (\sum x / N \times \text{Steigung})$$

$$r = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N(N-1)S_x S_y}$$

$$\text{Endotoxinkonzentration} = \text{antilog} \left[ \frac{\log \text{ durchschnittliche Reaktionszeit} - Y\text{-Achsenabschn.}}{\text{Steigung}} \right]$$

$x = \log_{10}$  Endotoxinkonzentration in EU/ml.

$y = \log_{10}$  durchschnittliche Reaktionszeit.

$N$  = Anzahl der verwendeten Standards.

$\sum x$  = Summe der  $\log_{10}$  Konzentration der verwendeten Standards in EU/ml.

$\sum y$  = Summe der  $\log_{10}$  Reaktionszeit.

$\sum xy$  = Summe der  $\log_{10}$  Standardkonzentrationen multipliziert mit  $\log_{10}$  durchschnittliche Reaktionszeit.

$$S_x = \text{Standardabweichung von } x = \sqrt{\frac{N\sum x^2 - (\sum x)^2}{N(N-1)}}$$

$$S_y = \text{Standardabweichung von } y = \sqrt{\frac{N\sum y^2 - (\sum y)^2}{N(N-1)}}$$

### Berechnungen mit Beispieldaten:

$$N = 5$$

$$\begin{aligned} \sum x = 1,50514998 &= \{-2,30103000 - 1,30103000 - 0,30103000 \\ &+ 0,69897000 + 1,69897000\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum y = 15,88460488 &= \{3,63858908 + 3,39724458 + 3,14798532 \\ &+ 2,95182304 + 2,74896286\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum xy = -7,00641653 &= \{-2,30103000 \times 3,63858908\} + \{-1,30103000 \times 3,39724458\} \\ &+ \{-0,30103000 \times 3,14798532\} \\ &+ \{0,69897000 \times 2,95182304\} \\ &+ \{1,69897000 \times 2,74896286\} \end{aligned}$$

$$S_x = 1,58113883$$

$$S_y = 0,35225503$$

$$r = \frac{5(-7,00641653) - (-1,50514998)(15,88460488)}{5(5-1)(1,58113883)(0,35225503)} = -0,99857152$$

$$\text{Steigung} = \frac{0,35225503}{1,58113883} \times -0,99857152 = -0,22246740$$

$$\begin{aligned} \text{Y-Achsenabschnitt} &= \frac{15,88460488}{5} - \left[ \frac{-1,50514998}{5} \times (-0,22246740) \right] \\ &= 3,17692098 - [(-0,30103000) \times (-0,22246740)] = 3,10995162 \end{aligned}$$

**Probe 1**  
Endotoxinkonz.

$$\begin{aligned} \text{EU/ml} &= \text{antilog} \left[ \frac{3,19755621 - 3,10995162}{-0,22246740} \right] \\ &= \text{antilog} \{-0,39378622\} \\ &= 0,404 \text{ EU/ml} \end{aligned}$$

**Probe 2**  
Endotoxinkonz.

$$\begin{aligned} \text{EU/ml} &= \text{antilog} \left[ \frac{2,97451169 - 3,10995162}{-0,22246740} \right] \\ &= \text{antilog} \{0,60880796\} \\ &= 4,063 \text{ EU/ml} \end{aligned}$$

## POWERCURVE™

Wenn der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten ( $r$ )  $\geq 0.980$  beträgt, kann der Anwender ein polynomiales Modell zur Erstellung einer Standardkurve verwenden und damit Endotoxinkonzentrationen der Proben berechnen. Es wurde gezeigt, dass dieses polynomiale Modell (POWERCURVE™) die Genauigkeit der Rückberechnung der Endotoxinkonzentrationen über den gesamten (5-log) Endotoxinbereich verbessert. Eine Verwendung des POWERCURVE™ Modells erfordert den Einsatz der WinKQCL™ Software.

Bei der Verwendung von POWERCURVE™ wird mit den  $\log_{10}$  Reaktionszeiten und ihrer korrespondierenden  $\log_{10}$  Endotoxinkonzentration eine Standardkurve zur Bestimmung der polynominalen Gleichung erstellt. Die Ordnung der zur Erstellung der Regressionskurve verwendeten polynominalen Gleichung ist durch die Anzahl der Endotoxinstandards im Assay festgelegt. Die Ordnung der polynominalen Gleichung liegt immer einen Wert unter der Anzahl der Endotoxinstandards, mit einer polynominalen Gleichung maximal vierter Ordnung für Assays mit fünf oder mehr Endotoxinstandards und minimal zweiter Ordnung für Assays mit drei Endotoxinstandards

Die Suche nach Lösungen dieser polynomialen Gleichungen erfolgt bequem durch POWERCURVE™ in der WinKQCL™ Software. Das folgende Beispiel zeigt die Lösung einer polynomialen Gleichung mit dem gleichen Datensatz wie im Beispiel zur linearen Korrelation auf Seite 18.

### Polynomiales Modell (POWERCURVE™)

---

$$Y = A + BX + CX^2 + DX^3 + EX^4$$

---

$$A = 3,0837355$$

---

$$B = -0,2043195$$

---

$$C = 0,0289368$$

---

$$D = -0,0059597$$

---

$$E = -0,0050336$$

---

Diese Standardkurvenparameter sind auf dem Ausdruck des Berichts aufgeführt. Die POWERCURVE™ Funktion der WinKQCL™ Software verwendet diese Parameter zur Berechnung der entsprechenden Endotoxinkonzentration aus der Reaktionszeit jeder Probe. Die Software passt automatisch die **Endergebnisse des Tests** an, um Produktverdünnungen einzubeziehen.

Es ist darauf zu achten, dass das polynomiale Modell POWERCURVE™ **NICHT** für **Initiale Qualifizierungstests** verwendet werden kann. In diesen Fällen ist immer noch die lineare Regression zu verwenden. Zudem wurde das polynomiale Modell POWERCURVE™ nur für die Kinetic-QCL™ und PYROGENT™-5000 Reagenzien von Lonza evaluiert.

## Hemmung des Tests durch die Probe

Eine Hemmung des Tests durch das Produkt tritt auf, wenn Substanzen in der Probe die LAL-Reaktion stören. Beim Kinetic-QCL™ Assay führt diese Hemmung zu einer verlängerten Reaktionszeit, was einen geringeren Endotoxingehalt anzeigt als möglicherweise in der Probe vorhanden ist. Für jede spezifische Probe, entweder unverdünnt oder in entsprechender Verdünnung, sollte sichergestellt werden, dass keine Hemmung durch das Produkt vorliegt.

Um nachzuweisen, dass keine Hemmung durch das Produkt vorliegt, wird einem Aliquot einer Probe (oder Probenverdünnung) eine bekannte Menge an Endotoxin zugesetzt.

Es wird empfohlen, dass die Endkonzentration des zugesetzten Endotoxins in der Probe 0,5 EU/ml beträgt. Bei Proben, die selbst schon eine Endotoxinkonzentration von >1 EU/ml enthalten könnten, sollte die Endkonzentration des zugesetzten Endotoxins in der Probe 5,0 EU/ml betragen.

Bei einem Hemmungs-/Verstärkungs-Assay werden die ursprüngliche sowie die mit Endotoxin versetzte Testlösung (PPC) zusammen untersucht, und ihre jeweiligen Endotoxinkonzentrationen sowie die Menge des in der PPC wiedergefundenen Endotoxins werden automatisch berechnet. Die Wiederfindung sollte im Bereich von 50–200 % der bekannten, zugegebenen Endotoxinkonzentration liegen<sup>8</sup>.

Die Versetzung eines Aliquots der Probe (oder Probenverdünnung) kann wie in den folgenden Beispielen erfolgen:

### **Röhrchenmethode**

50 µl der 50,0 EU/ml Lösung in 4,95 ml der Probe (oder Probenverdünnung) geben. Diese Lösung enthält eine Endotoxinkonzentration von 0,5 EU/ml in der Probe (oder Probenverdünnung). Diese Probe sollte vor ihrem Gebrauch 1 Minute auf einem Vortex-Mischer bei hoher Drehzahl kräftig geschüttelt werden.

100 µl dieser Lösung in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte geben, wie in der Assay-Vorlage vorgegeben.

### **Plattenmethode 1**

10 µl der 50,0 EU/ml Lösung in jedes der PPC-Wells der 96-Well-Platte geben, wie in der Assay-Vorlage vorgegeben. Zu diesen Wells 0,1 ml der Probe (oder Probenverdünnung) hinzugeben. Jedes Well enthält nun eine Lösung mit 0,5 EU/ml. Zum vorsichtigen Mischen Platte seitlich antippen.

## Plattenmethode 2

0,1 ml der Probe (oder Probenverdünnung) in die PPC-Wells in der 96-Well-Platte geben, wie von der Assay-Vorlage vorgegeben. Zu diesen Wells 10 µl der 5,0 EU/ml Lösung hinzugeben. Jeder Well enthält nun eine Lösung mit 0,5 EU/ml. Zum vorsichtigen Mischen Platte seitlich antippen.

Wenn sich herausstellt, dass die Probe (oder Probenverdünnung) die Kinetic-QCL™ Reaktion hemmt, muss die Probe evtl. weiter verdünnt werden, bis diese Hemmung überwunden ist.

### Beispiel: Bestimmung einer nicht hemmenden Verdünnung

Probenverdünnung	wiedergefundenes Endotoxin [EU/ml]
1/10	0,125 hemmend
1/20	0,212 hemmend
1/40	0,550 nicht hemmend

Zu Beginn kann auf eine Hemmung durch das Produkt überprüft werden, indem eine 10-fach Verdünnungsreihe der Probe getestet wird. Sobald die ungefähre nicht hemmende Verdünnung bestimmt wurde, kann die genaue Verdünnung durch Testen einer 2-fach Verdünnungsreihe um diese Verdünnung herum bestimmt werden.

## Einschränkungen und Hinweise

Der Grad der Hemmung oder Verstärkung wird von der Produktkonzentration abhängen. Sollen mehrere Konzentrationen des gleichen Produkts untersucht werden, müssen voneinander unabhängig die jeweiligen Wechselwirkungen mit dem Test bestimmt werden.

Es könnten Muster von Hemmungen oder Verstärkungen auftreten, die von denen in herkömmlichen LAL-Geltests abweichen.

Es kann erforderlich sein, den pH-Wert der Probe mit endotoxinfreiem Natriumhydroxid oder Salzsäure auf einen Wert zwischen 6,0 und 8,0 einzustellen, um die Hemmung zu überwinden.

## Farbige Proben

Da der erste Messwert der Absorption in jedem Well als Basislinie verwendet wird, stellen Proben, die selbst deutlich gefärbt sind, kein besonderes Problem dar. Wenn die Hintergrundfarbe  $\geq 1,5$  Absorptionseinheiten entspricht, sollte die Probe verdünnt und erneut untersucht werden.

## Archivierte Standardkurve

Die WinKQCL™ Software kann Testläufe mit einer archivierten Standardkurve auswerten. Voraussetzung ist, dass die aktuellen Chargennummern für Kinetic-QCL™ Reagenz, LAL-Reagenz-Wasser und Endotoxin sowie die Parameter des Readers mit denen übereinstimmen, die zur Erzeugung einer gültigen archivierten Standardkurve verwendet wurden. In diesem Fall kann die archivierte Standardkurve verwendet werden, anstatt neue Endotoxinstandards auf der 96-Well-Platte zu platzieren.

Wird eine archivierte Standardkurve verwendet, sollte eine einzelne Standardkontrolle untersucht werden, deren Endotoxinkonzentration dem Mittelpunkt (auf logarithmischer Basis) zwischen der Endotoxinkonzentration des höchsten und des niedrigsten Endotoxinstandards der archivierten Standardkurve entspricht. Die berechnete Endotoxinkonzentration sollte sich innerhalb von  $\pm 25\%$  ihres bekannten Werts befinden.

Beispielsweise sollte für einen Assay mit einer Standardkurve zwischen 50,0 und 0,005 EU/ml eine Standardkontrolle von 0,5 EU/ml mitgetestet werden.

$$\begin{array}{rcl} \log 50,0 & = & 1,6990 \\ \log 0,005 & = & -2,3010 \\ \hline \log \text{Durchschnitt} & = & -0,3010 \\ \text{antilog } -0,3010 & = & 0,5 \end{array}$$

Für einen Assay mit einer Standardkurve zwischen 1,0 und 0,01 EU/ml sollte eine Standardkontrolle von 0,1 EU/ml mitgetestet werden.

$$\begin{array}{rcl} \log 1,0 & = & 0,0000 \\ \log 0,01 & = & -2,0000 \\ \hline \log \text{Durchschnitt} & = & -1,0000 \\ \text{antilog } -1,0000 & = & 0,1 \end{array}$$

## Korrelation mit anderen Methoden

In den USA reguliert die Behörde FDA die offizielle Verwendung der LAL-Tests. Die Wirkstärke unterschiedlicher Endotoxinpräparate variiert sowohl bei herkömmlichen LAL-Geltests als auch bei der chromogenen Methode. Der in diesem Kit mitgelieferte Endotoxinstandard wurde unter Verwendung des Kinetic-QCL™ Assay mit dem Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) abgeglichen. Die Wirkstärke beträgt 50,0 EU/ml, wenn er mit dem auf dem chargenspezifischen Analysenzertifikat angegebenen Volumen rekonstituiert wurde. Die aus diesem Standard durch Verdünnung erstellte Kalibrierkurve erlaubt Tests in einem Bereich zwischen 0,005 und 50,0 EU/ml (Endotoxineinheiten pro Milliliter) relativ zum RSE. Es ist daran zu erinnern, dass die herkömmlichen LAL-Geltests mit einer 2-fach Verdünnungsreihe standardisiert werden, sodass die Abweichungen recht groß sind. Im Vergleich dazu ist im Kinetic-QCL™ Test die Standardisierung fortlaufend und Abweichungen minimal.

## Hinweis für unsere internationalen Kunden

Andere Behörden haben unter Umständen abweichende Standards zur Qualität des Tests eingeführt, und deren Einhaltung ist in den entsprechenden regionalen Geltungsbereichen zu beachten.

## Quellenangabe

1. Bang, F.B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 98:325 [1956].
2. Levin, J. and F.B. Bang. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115:265 [1964].
3. Levin, J. and F.B. Bang. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 115:337 [1964].
4. Levin, J. and F.B. Bang. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19:186 [1968].
5. Solum, N.O. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 23:170 [1970].
6. Solum, N.O. The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. *Thromb. Res.* 2:55 [1973].
7. Young, N.S., J. Levin, and R.A. Prendergast. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J. Clin. Invest.* 51:1790 [1972].
8. United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test. *United States Pharmacopeia* [USP].
9. European Directorate for the Quality of Medicines. Chapter 2.6.14 Bacterial Endotoxins Test. *European Pharmacopoeia* [EP].
10. Ministry of Health, Labour, and Welfare, General Chapter 4.0.1 Bacterial Endotoxins Test. *Japanese Pharmacopoeia* [JP].
11. U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers* [June 2012].

## Anmerkungen

## Kontaktinformationen

### Nordamerika

Kundendienst: +1 800 638 8174 (gebührenfrei)  
order.us@lonza.com  
Wissenschaftlicher  
Support: +1 800 521 0390 (gebührenfrei)  
scientific.support@lonza.com

### Europa

Kundendienst: +32 87 321 611  
order.europe@lonza.com  
Wissenschaftlicher  
Support: +32 87 321 611  
scientific.support.eu@lonza.com

### International

Wenden Sie sich an Ihren örtlichen Lonza-Vertreter  
Kundendienst: +1 301 898 7025  
Fax: +1 301 845 8291  
scientific.support@lonza.com

### Internationale Niederlassungen

Australien	+61 3 9550 0883
Belgien	+32 87 321 611
Brasilien	+55 11 2069 8800
Frankreich	0800 91 19 81 (gebührenfrei)
Deutschland	0800 182 52 87 (gebührenfrei)
Indien	+91 40 4342 4000
Japan	+81 3 6264 0660
Luxemburg	+32 87 321 611
Singapur	+65 6521 4379
Niederlande	0800 022 4525 (gebührenfrei)
Großbritannien	0808 234 97 88 (gebührenfrei)

---

Lonza Walkersville, Inc. – Walkersville, MD 21793

ELx808® ist eine Handelsmarke von BioTek Instruments, Inc.

Soweit nicht anders angegeben, sind alle hier enthaltenen Markenzeichen Eigentum der Lonza Group Ltd oder ihrer verbundenen Unternehmen. Die hier enthaltenen Informationen werden als korrekt betrachtet und entsprechen dem neuesten Stand wissenschaftlichen und technischen Wissens. Wir übernehmen jedoch keine Verantwortung oder Garantie jeglicher Art, weder ausdrücklich noch implizit, bezüglich der Genauigkeit oder der Ergebnisse, die sich aus der Nutzung solcher Informationen ergeben, und wir übernehmen keine ausdrückliche oder stillschweigende Garantie in Bezug auf die Verwendung dieser Produkte. Der Käufer übernimmt alle Risiken des Gebrauchs und/oder der Handhabung. Jeder Anwender muss selbst entscheiden und sich davon überzeugen, dass die von Lonza Group Ltd oder von verbundenen Unternehmen gelieferten Produkte und die von Lonza Group Ltd oder von verbundenen Unternehmen bereitgestellten Informationen und abgegebenen Empfehlungen (i) für das beabsichtigte Verfahren oder den Verwendungszweck geeignet sind, (ii) den rechtlichen Bestimmungen zum Umwelt-, Gesundheits- und Arbeitsschutz entsprechen und (iii) nicht gegen die geistigen Eigentumsrechte Dritter verstoßen.

© 2015 Lonza  
Alle Rechte vorbehalten.  
P50-650U-14-DE 12/15

RT-MN008-DE