

# Endotoxine – die unterschätzte Gefahr

Lars Rominger, Dr. Frank Stienecker



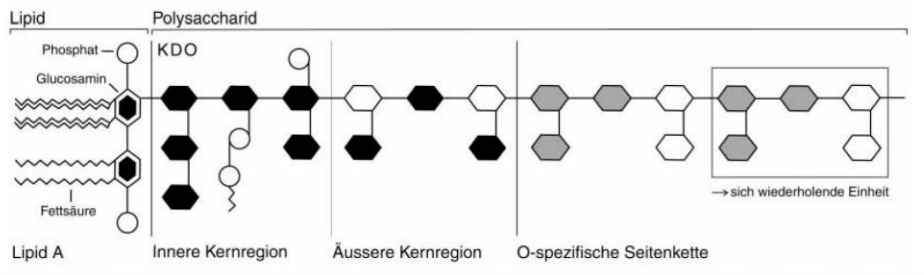
Endotoxine sind allgegenwärtig. Ihre Wirkung auf den menschlichen Körper ist zwar von verschiedenen Faktoren abhängig – sie können aber unter Umständen tödliche Folgen haben. In der Medizinaltechnik sind die Endotoxine bis heute zu wenig beachtet worden. Endotoxinfreie Produkte sind wichtig. Aseptisches partikelarmes Arbeiten ist Voraussetzung für endotoxinfreie Medizinalprodukte, reicht aber nicht aus. Hier sind neue Ansätze gefragt für die Sicherheit der Patienten!



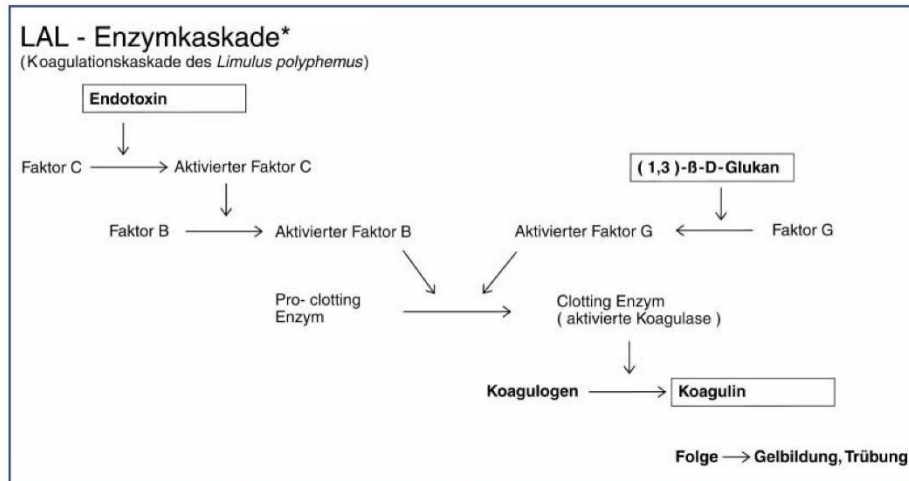
Ein *Limulus polyphemus* in freier Natur  
(Foto: Dr. Rainer Scheer, Pforzheim)

## Struktur eines Lipopolysaccharids\*

(Rietschel and Brade, 1992)



\* Das Bildmaterial wurde uns freundlicherweise von der Firma Pyroquant Diagnostik GmbH zur Verfügung gestellt. Die Firma ist führend auf dem Gebiet der Endotoxin- und Glukanbestimmung. Die Pyroquant Diagnostik GmbH vertreibt in Deutschland wie auch in der Schweiz alle Reagenzien, Geräte und Laborhilfsmittel zum Nachweis von Bakterien-Endotoxinen und (1-3)-β-D-Glukanen.



Endotoxine sind von gramnegativen Bakterien produzierte Giftstoffe, die im Gegensatz zu Ektotoxinen nicht aus den Organismen ausgeschleust werden, sondern in den Zellen und besonders auf der Zelloberfläche verbleiben. Sie sind thermostabil, an die zelluläre Substanz der Mikroorganismen gebunden und werden daher erst beim Zelltod freigesetzt. Endotoxine wirken

meist immunogen. Sie werden durch Immunsereinen weniger wirksam neutralisiert als Ektotoxine. Biochemisch handelt es sich um Lipopolysaccharide (LPS), die sich aus speziesspezifisch unterschiedlichen Polysaccharid-Ketten und einem relativ einheitlichen Lipid (Lipid A) zusammensetzen (siehe Abbildung). Oft werden deshalb die Begriffe Endotoxin und Lipopolysaccharid synonym benutzt. Die toxische Eigenschaft der Endotoxine ist durch das Lipid A bedingt. Seine Aktivität wird allerdings durch den Polysaccharid-Anteil modifiziert.

### Allgegenwärtig in der Umwelt

Gramnegative Bakterien werden überall gefunden. Sie begleiten uns durchs ganze Leben. Sie sind ein Naturstoff und kommen in verschiedenen Konzentrationen überall in unserer Umwelt vor. Beispielsweise in der Wohnung, in der Landwirtschaft und in verschiedenen Industrien. Sie besiedeln die Haut und den Darm des Menschen, sind in der Luft an Partikeln adsorbiert und befinden sich im Wasser. Eine Sterilisation von Gegenständen oder von Wasser führt lediglich zum Tod dieser Bakterien und damit zur Freisetzung der Endotoxine. Endotoxine selbst werden gut von Oberflächen adsorbiert und dann durch kompetitive Verdrängung aus der Bindungsstelle freigesetzt.

### Lungenprobleme bei hoher Endotoxinbelastung

Zeitpunkt und Dosis der Exposition spielen im Regelfall eine wichtige Rolle, ob Endotoxine zu gesundheitlichen Problemen führen. An einigen Arbeitsplätzen ist die Konzentration an Endotoxinen erhöht. Hohe Endotoxinbelastungen weisen zum Beispiel Arbeitsplätze in der Landwirtschaft, in der baumwollverarbeitenden Industrie, in Geflügelschlachtereien oder in der metallverarbeitenden Industrie auf. Schon seit längerer Zeit bekannt und auch untersucht ist der Zusammenhang von Endotoxinbelastung und Lungenfunktionsveränderung bei Baumwollarbeitern.

### Unterschiedliche Wirkung

Die Wirkung von Endotoxinen ist unterschiedlich und hängt von verschiedenen Faktoren ab. Auf der einen Seite spielen beispielsweise die Eintrittspforte bzw. der Wirkort und die Konzentration eine wichtige Rolle. Auf der anderen Seite ist die Disposition der betroffenen Person für die unterschiedliche Wirkung im Organismus verantwortlich.

Beim Arbeiten in einer Umgebung mit hoher Endotoxinbelastung werden diese über die Atemwege inhaled. Akute Endotoxininhalationen können Husten verursachen, die Lungenfunktion beeinträchtigen und grippeähnliche Symptome hervorrufen. Die Dauereexposition kann zu chronischer Bronchitis führen.

### Mikrobielle Vergiftung

Bei einer parenteralen Intoxination (über die Blutwege) tritt die Wirkung der Endotoxine schneller und heftiger ein. Gelangen die Endotoxine beispielsweise bei einem chirurgischen Eingriff in den Organismus, wirken diese systemisch. Sie führen zu plötzlich auftretendem hohem Fieber. In der Blutbahn genügen bereits kleinste Mengen, um Fieber zu erzeugen. Für die Sicherheit der Patienten ist es deshalb besonders wichtig, dass mit endotoxinfreien Medizinprodukten gearbeitet wird. Reinheit bis ins aller kleinste Detail ist gefragt. Dieses gilt besonders für implantierbare Medizinprodukte oder Medizinprodukte, die mit Implantaten in Kontakt kommen. Auch endotoxinbelastete Hilfsmittel für die Zellkultur können negative Auswirkungen auf das Zellwachstum und nach Implantation autologer Zellen in den Körper Auswirkungen auf die Verträglichkeit haben.

### Gefahr erkannt

Bereits allein durch die Berührung des Menschen, via seinen Atem, durch die Luft, durch (auch gereinigtes) Wasser gelangen Endotoxine auf die Oberfläche von Medizinprodukten. Metalle wirken oft bakterizid und stellen keine ideale Besiedlungs-

fläche für Bakterien dar – ganz im Gegensatz zu den Kunststoffen. Deshalb ist hier besonders umsichtiges Arbeiten wichtig. Aseptisch partikelarmes Arbeiten ist zwar Voraussetzung für endotoxinfreie Medizinprodukte, das reicht aber nicht aus. Denn:

- Steril bedeutet nicht automatisch endotoxinfrei.
- Partikelfrei bedeutet nicht automatisch endotoxinfrei.

Für endotoxinfreie Produkte müssen die vorhandenen Mikroorganismen nicht nur getötet, sondern auch entfernt werden. Eine reine Desinfektion reicht nicht aus. Die GEMÜ GmbH unternimmt vieles, damit keine gramnegativen Bakterien in den Produktionsprozess der Medizinprodukte gelangen. Reinraumbedingungen, analog zur Herstellung von parenteral applizierbaren Arzneimitteln, werden in Zukunft implementiert. Wenn keine gramnegativen Keime in den Rohmaterialien oder im Produktionsprozess nachgewiesen werden können, gibt es auch keine Endotoxine auf den Endprodukten. Dabei werden Endotoxine durch den LAL-Test spezifisch nachgewiesen (LAL-Enzymkaskade siehe Abbildung). Die Nachweisgrenze liegt im Bereich Nanogramm/ml. Dank diesen Bemühungen werden in Zukunft nicht nur endotoxinfreie Metalle im Medizinbereich eingesetzt, sondern auch endotoxinfreie Plastikteile. Für die Sicherheit der Patienten.

### Zu den Autoren:



Dr. Frank Stieneker leitet die Geschäftsstelle der Arbeitsgemeinschaft für pharmazeutische Verfahrenstechnik (APV) in Mainz. Parallel ist er Lehrbeauftragter an der Universität Frankfurt im Fach Pharmazeutische Technologie.



Lars Rominger ist Leiter Marketing/Verkauf Medizintechnik bei der GEMÜ GmbH Schweiz.



# Endotoxins – the Underestimated Danger

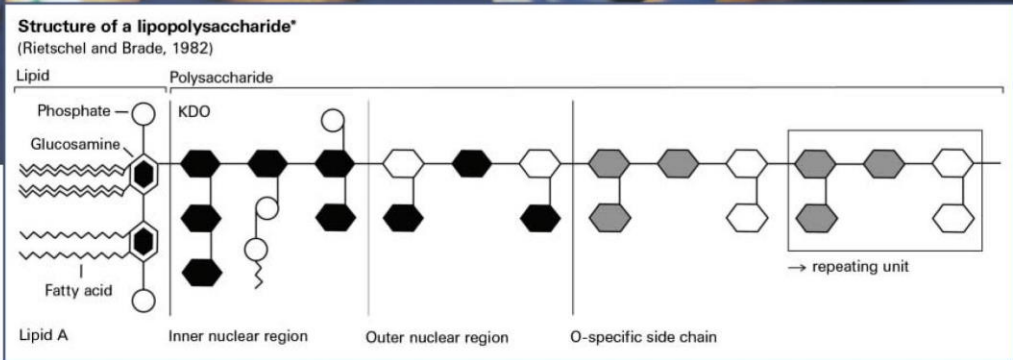
Lars Rominger, Dr. Frank Stieneker



Endotoxins are omnipresent. Their effect on the human body is dependent on various different factors – but under certain circumstances they can in fact be fatal. However, up till now too little attention has been paid to endotoxins in the field of medical engineering. It is important that the products are kept free from endotoxins. An aseptic working procedure, with low particle content, is a precondition for the manufacture of endotoxin-free medical products, but this alone is not enough. Here new measures are demanded, for the safety of the patients!



A *Limulus polyphemus* in its natural environment  
(Photo: Dr. Rainer Scheer, Pforzheim)



\* The diagrams and illustration were kindly made available to us by the Pyroquant Diagnostik GmbH. This firm is a leader in the field of endotoxin and glucan determination. Pyroquant Diagnostik GmbH markets in Germany, and also in Switzerland, all the reagents, equipment and laboratory aids for the detection of endotoxins and (1-3)-β-D-glucans.

Endotoxins are toxins that are produced by gram-negative bacteria. Unlike ectotoxins, they are not excreted from the body but remain in the cells, and especially on the surface of the cells. They are thermostable and are bound to the cellular substance of the microorganisms, and are therefore only released at the moment of cell death. The effect of the endotoxins is mostly immunogenic. They are neutralised by antisera less effectively than ectotoxins. Biochemically they are lipo-polysaccharides (LPS), which are composed of different species-specific polysaccharide chains and a relatively uniform lipid (lipid A) (see diagrams). The terms "endotoxin" and "lipopolysaccharide" are therefore often used as synonyms. The toxic property of the endotoxins is determined by the lipid A. Its activity is, however, modified by the polysaccharide portion.

### Omnipresent in the Environment

Gram-negative bacteria are to be found everywhere. They accompany us throughout our whole life. They are a natural substance and occur in different concentrations everywhere in our environment, for example at home, in the agricultural environment and in different industries. They colonise the human skin and the intestines, are adsorbed onto particles in the air and are also to be found in water. The sterilisation of articles or of water leads to the death of these bacteria, and thus to the release of the endotoxins. The endotoxins themselves are well adsorbed by different surfaces and are then released from the bonding site by competitive displacement.

### Pulmonary Problems with High Endotoxin Levels

As a rule, the time and the amount of the exposure to endotoxins are the factors that determine whether they will lead to health problems. In certain workplaces the concentration of endotoxins present can be high. High endotoxin levels are to be found, for example, at some workplaces in the agricultural sector, in the cotton-processing industry, in chicken slaughterhouses or in the metal-processing industries. The connection between endotoxin levels and changes in the pulmonary function in persons working in the cotton industry has been known for a long time and has also been investigated.

### Different Effects

Endotoxins can have different effects, depending on different factors. On the one hand, the portal of

entry or the site of action and the concentration, for example, can play an important role. On the other hand, the predisposition of the person concerned is responsible for the different effects in the organism.

When working in an environment with high endotoxin levels, these are inhaled through the airways. Acute inhalation of endotoxins can cause coughing, impair the pulmonary function and lead to influenza-like symptoms. Long-term exposure can lead to chronic bronchitis.

### Microbial Intoxication

In the case of a parenteral intoxication (through the blood stream), the effect of the endotoxins is more rapid and more severe. If endotoxins pass directly into the organism, for example in the course of a surgical intervention, they have a systemic effect. They lead to sudden high fever. Only very small amounts in the blood stream are sufficient to cause fever. For the safety of the patients it is therefore particularly important to work with medical products that are free from endotoxins. Purity down to the smallest detail is what is required. This applies especially for implantable medical products, or for medical products that come into contact with implants. Adjuvants that are contaminated with endotoxins and are then used in cell cultures can also have negative effects on the cell growth, and after the implantation of autologous cells in the body can cause effects on the tolerability.

### The Danger is Known

Simply through contact with a person, through his breath, through the air or through water (even purified), endotoxins can get onto the surface of medical products. Certain metals often have a bactericidal effect and are not an ideal surface for the colonisation of bacteria – in absolute contrast to plastic materials. Here it is therefore particularly important to work prudently. Although working in an aseptic, particle-free environment is a prerequisite for the manufacture of medical products that

are free from endotoxins, this is in fact not sufficient, because:

- sterile does not automatically mean endotoxin-free;
- particle-free does not automatically mean endotoxin-free.

For endotoxin-free products, the microorganisms that are present must not only be killed, but must also be removed. Simple disinfection is therefore not sufficient. GEMÜ GmbH makes great efforts to ensure that no gram-negative bacteria find their way into production process for medical products. Clean-room conditions, similar to those applied for the manufacture of parenterally administered drugs, will be implemented in the future. If no gram-negative germs can be detected in the raw materials or in the production process, then there will also be no endotoxins on the end-products. The presence of endotoxins is detected specifically by means of the LAL test (LAL enzyme cascade, see Diagram). The detection limit lies in the nanogram/ml range. Thanks to these efforts, in future not only endotoxin-free metals will be used in the medical field, but also endotoxin-free plastic components – for the safety of the patients.

### About the authors:



Dr. Frank Stieneker is Head of the Business Unit of the Working Association for Pharmaceutical Procedural Technology (AVP) in Mainz. At the same time he is a Lecturer in Pharmaceutical Technology at the University of Frankfurt.



Lars Rominger is Head of Marketing/Sales, Medical Engineering, at GEMÜ GmbH Switzerland.

