

Fehlermöglichkeit des Limulus-Amoebocyten-Lysat-Testes bei der Endotoxinbestimmung im Serum

D. Berger, H. G. Beger

Abteilung für Allgemeinchirurgie der Universität Ulm (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. G. Beger)

Zusammenfassung:

Die Bedeutung der Endotoxinämie bei verschiedenen Krankheitsbildern ist trotz zahlreicher Untersuchungen nach wie vor ungeklärt. Die widersprüchlichen Ergebnisse der Literatur sind vorwiegend methodisch bedingt. Der zum Endotoxinnachweis allgemein verwendete Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test wird durch Serum oder Plasma gestört. Ein weiterer, bislang nicht berücksichtigter Punkt ist die mangelnde Vergleichbarkeit verschiedener Limulus-Amoebocyten-Lysat-Präparationen. Aufgrund der durch den Test bedingten falschen Ergebnisse werden, wie am Beispiel des hämorrhagischen Schocks kurz dargestellt, falsche Schlüsse zur pathogenetischen Bedeutung des Endotoxins gezogen.

Schlüsselwörter:

Endotoxinämie – Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Summary:

The clinical relevance of endotoxemia in the course of certain disease is still unclear. Inconsistent results of several studies are caused by methodological problems. Protein containing fluids as serum or plasma inhibit or amplify the test. Another problem is the uncomparability of different lysates which produce incorrect results. So wrong conclusions concerning the relevance of endotoxin for the pathogenesis of certain disease can be made.

Keywords:

Endotoxemia – Limulus-Amoebocyten-Lysate-Test

Einleitung

Gramnegative Bakterien sind die häufigsten Erreger einer Sepsis im chirurgischen Krankengut (1). Die typischen klinischen Erscheinungen einer gramnegativen Bakteriämie lassen sich auch nach Verabreichung von bakteriellen Lipopolysacchariden, auch Endotoxine genannt, beobachten (7). Diese sind Hauptbestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien und werden vor allem bei deren Zerfall an das umgebende Milieu freigesetzt (9).

Aufgrund der Ähnlichkeit der Endotoxinämie und der gramnegativen Septikämie versuchte 1970 Levin (10) erstmals, Endotoxin mit Hilfe des Limulus-Amoebocyten-Lysat-Testes in menschlichem Plasma zu bestimmen. Dieser Nachweis beruht auf einer proteolytischen Gelierungsreaktion, die abläuft, wenn ein primär lösliches Lysat der Blutkörperchen des Pfeilschwanzkrebses in Anwesenheit von Calciumionen mit Endotoxin in Berührung kommt.

Die klinische Wertigkeit dieses Testes ist trotz zahlreicher Untersuchungen nach wie vor umstritten (4, 6, 14). Ein Grund hierfür ist die Unmöglichkeit, Serum oder Plasma direkt in den LAL-Test einzusetzen. Die Gelierungsreaktion wird durch Plasmaproteine sowie Gallensäuren oder verschiedene Medikamente inhibiert oder auch verstärkt (8). Um solche Substanzen auszuschalten, wurden verschiedene Extraktionsverfahren entwickelt. Beger et al. (2) konnten jedoch zeigen, daß diese Verfahren entweder zu einem erheblichen Verlust der ursprünglich vorhandenen Endotoxinmenge führen oder aber inhibitorisch oder verstärkend wirkende Substanzen unvollständig eliminieren. Die vorliegenden Untersuchungen ergeben eine wei-

tere Erklärungsmöglichkeit für unterschiedliche Ergebnisse klinischer Studien. Nach Reinigung des Endotoxins aus Serum oder Plasma weisen verschiedene Limulus-Tests unterschiedliche Endotoxinmengen nach.

Material und Methoden

Routinemäßig wird der Pyrogen-Test der Firma Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach, BRD, verwendet. Der Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test der Firma Pyroquant Diagnostica, Walldorf, BRD, wird verglichen. Endotoxin-Standards zur Erstellung der Eichgeraden sind zusammen mit den Lysaten erhältlich. Beide Tests werden nach Vorschrift zur Verwendung in pyrogenfreiem Wasser aufgenommen. Zu 0,02 ml des jeweiligen Lysates werden 0,02 ml der zu untersuchenden Probe pipettiert. Ein Test wird als positiv bewertet, wenn sich nach einer Inkubationsdauer von 1 Std. bei 37°C ein trübes Gel gebildet hat, das nach Kippen um 180° am Boden des Teströhrchens haften bleibt. Zur Quantifizierung der zu messenden Endotoxinmenge werden in Zehnerschritten Verdünnungsreihen unter Verwendung von pyrogenfreiem Wasser durchgeführt.

Serumproben von 12 gesunden Probanden und 8 Patienten, die an einer diffusen eitrigen Peritonitis erkrankt waren, wurden für vier bis acht Wochen bei –20°C gelagert. In diesem Zeitraum kommt es nicht zu einer Änderung der ursprünglich vorhandenen Endotoxinmenge.

Zum Einsatz in den LAL-Test werden die Serumproben durch eine modifizierte Phenol-Wasser-Extraktionsmethode nach Westphal (16) behandelt. Hierzu werden

0,5 ml Serum über eine Ultrafiltration, Ausschlußmolekulargewicht ca. 10000, auf 0,05 ml eingengt. Nach Auffüllen auf ca. 0,5 ml mit pyrogenfreiem Wasser werden 2 ml eines 69°C warmen Phenol-Wasser-Gemisches (45 Teile Phenol, 55 Teile Wasser) zugegeben und 10 min bei 69°C inkubiert. Bei dieser Temperatur liegt das Gemisch monophasisch vor. Nach Abkühlen und Zentrifugation bei 2000×g trennen sich die Phasen, und die aufschwimmende endotoxinhaltige Wasserphase wird abgehoben. Das abgehobene Volumen wird mit pyrogenfreiem Wasser wieder aufgefüllt und der Extraktionsvorgang wiederholt. Die gesammelten Überstände werden auf 0,1 bis 0,2 ml eingengt und die darin enthaltenen Phenolreste durch Ausschütteln mit Äther entfernt. Die jetzt erhaltenen Wasserphasen werden lyophilisiert und zum Einsatz in den Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test wieder in 500 µl H₂O aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

Tab.1 zeigt die Empfindlichkeit der Tests gegenüber den mit dem Test mitgelieferten Standard-Endotoxin-Präparationen. In wäßriger Lösung ist die Nachweisgrenze bei der Tests gegenüber dem Pyrogent-Standard identisch und entspricht für den Pyroquant-Test den Angaben im Manual. Die Nachweisgrenze gegenüber dem Novopyrexal-Standard liegt bei beiden Tests bei 0,1 ng/ml. Im Manual des Pyroquant-Testes wird dagegen eine untere Nachweisgrenze von 0,012 ng/ml angegeben. Als Erklärung kann ein fehlerhaftes Lysat oder ein fehlerhafter Standard angeführt werden. Da die Ergebnisse jedoch auch bei Verwendung anderer Chargen identisch bleiben, ist dieser Befund nicht weiter zu klären.

Tab.2 zeigt die Endotoxinspiegel gesunder Probanden nach Bestimmung mit beiden Tests. Der Pyroquant-Test weist Endotoxinkonzentrationen von 1 und 10 ng/ml nach. Solche Konzentrationen finden sich allenfalls bei Patienten mit schweren septischen Erkrankungen. Auch bei Patientenserum weist der Pyroquant-Test zu hohe Spiegel nach (Tab.3).

Die Richtigkeit der Ergebnisse des Pyrogent-Testes nach Phenol-Wasserextraktion wurde mehrfach überprüft. Recovery-Untersuchungen mit radioaktiv markierten und nichtmarkierten Endotoxin-Präparationen ergaben eine

Tab. 1: Empfindlichkeit der Lysate in wäßriger Lösung gegenüber den Endotoxin-Standardpräparationen

	Pyrogent-standard	Novo-Pyrexal
Pyrogent-Test	0,025 ng/ml	0,1 ng/ml
Pyroquant-Test	0,025 ng/ml	0,1 ng/ml

Tab.2: Endotoxinserumspiegel 12 gesunder Probanden nach Phenolwasserextraktion in ng/ml

Probanden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pyrogent-Test	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pyroquant-Test	10	10	10	1	10	1	10	10	1	1	1	1

Tab.3: Endotoxinserumspiegel von 8 Patienten nach Phenolwasserextraktion in ng/ml

Patienten	1	2	3	4	5	6	7	8
Pyrogent-Test	0	0	0	0	0	10	10	10
Pyroquant-Test	10	1	1	4	10	>100	>100	>100

Wiederfindungsrate von 100%. Eine Inhibition oder Verstärkung des Testes war nicht nachzuweisen. Außerdem ist es bedeutungslos, ob Serum oder Plasma verwendet wird. Demgegenüber ergibt der Pyroquant-Test unzuverlässige Ergebnisse. Die gemessenen Endotoxinspiegel liegen viel zu hoch. Der Pyroquant-Test wurde als Einzelbeispiel gewählt, da zahlreiche Arbeitsgruppen auf ihn zurückgreifen (3, 5, 15). Ein solcher Test ist für die Endotoxinbestimmung im Blut unbrauchbar, er führt sogar zu Fehlinterpretationen verschiedener Krankheitsbilder. So wiesen Fink et al. bei Patienten im hämorrhagischen Schock Endotoxin im Blut nach (5). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Tierexperimenten erzielt (12, 13). Als Ursache für die Endotoxinämie wurde eine vermehrte Durchlässigkeit der Darmwand durch eine ischämische Schädigung angeführt. Eigene Untersuchungen an Patienten im hämorrhagischen Schock ergaben keine nachweisbaren Endotoxinspiegel. Auch bei Lebererkrankungen wird Endotoxin als pathogenetischer Faktor diskutiert (8, 11). Auch diese Ergebnisse sind durchaus mit Vorsicht zu interpretieren, da einmal lysat-bedingte Fehlbestimmungen nicht auszuschließen sind, zum anderen im Plasma vorhandene Störfaktoren des Testes ungenügend eliminiert wurden. Sollen klinische Studien zur Endotoxinämie Aufschluß über die Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder geben, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Einmal muß eine Inhibition oder Verstärkung des Limulus-Amoebocyten-Lysat-Testes durch die eingesetzte Probe ausgeschlossen werden, zum anderen muß die Richtigkeit der durch das jeweilige Lysat gelieferten Ergebnisse überprüft werden.

Schrifttum:

1. BEGER, H. G., BITTNER, R., ZACHERL, H.: Toxische Schockformen. Chirurg 53, 74-80 (1982).
2. BEGER, H. G., ZACHERL, H., MARZINZIG, E.: Detection of Lipopolysaccharide in Human Blood by Phenol-Water-Extraction and Ultrafiltration. Europ. J. Clin. Invest. in press (1984).
3. DITTNER, B., BECKER, K.-P., URBASCHEK, R., URBASCHEK, B.: Quantitativer Endotoxin-Nachweis. Arzneim.-Forsch./Drug. Res. 33 (I), 5 (1983).
4. ELIN, R. J., ROBINSON, R. A., LEVINE, A. S., WOLFF, S. M.: Lack of clinical usefulness of the limulus test in the diagnosis of endotoxemia. N. Engl. J. Med. 521-523 (1975).
5. FINK, P. C., GRUNERT, J. H.: Endotoxemia in Intensive Care Patients: A Longitudinal Study with the Limulus Amebocyte Lysate Test. Klin. Wschr. 62, 986-991 (1984).
6. FOSSARD, P., KAKKAR, V. V., ELSEY, P. A.: Assessment of Limulus Test for Detecting Endotoxaemia. Br. Med. J. 2, 465-468 (1974).
7. HARDAWAY, R. M.: Endotoxemic shock. Dis. Colon Rectum 23, 597-604 (1980).
8. JACOB, A. I., GOLDBERG, P. K., BLOOM, N., DEGENSHEIM, G. A., KOZINN, P. J.: Endotoxin and bacteria in portal blood. Gastroenterology 72, 1268-1270 (1977).
9. JANDA, J., WORK, E.: A colorimetric estimation of lipopolysaccharides. FEBS Letters 16, 343-345 (1971).
10. LEVIN, J., POORE, T. E., ZAUBER, N. P., OSER, R. S.: Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to gram-negative bacteria. N. Engl. J. Med. 24, Vol. 283, 1313-1316 (1970).
11. LIEHR, H., GRÜN, M.: Endotoxine und RES-Funktion in der Pathogenese von Lebererkrankungen. Internist 17, 122-128 (1976).
12. RAVIN, H. A., ROWLEY, D., JENKINS, C., FINE, J.: On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal. J. exp. Med. 12, 783-792 (1960).
13. SANDFORD, J. P., NOYES, H. E.: Studies on the absorption of escherichia coli endotoxin from the gastrointestinal tract of dogs in the pathogenesis of "irreversible" hemorrhagic shock. J. Clin. Invest. 37, 1425-1435 (1958).
14. STUMACHER, R. J., KOVNAT, M. J., McCABE, W. R.: Limitations of the usefulness of the limulus assay for endotoxin. N. Engl. J. Med. 24, Vol. 288, 1261-1264 (1973).
15. TSUJI, K., STEINDLER, K. A., HARRISON, S. J.: Limulus Amebocyte Lysate Assay for Detection and Quantitation of Endotoxin in a Small-Volume Parenteral Product. Appl. Environ. Microbiol. 4, Vol. 40, 533-538 (1980).
16. WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., BISTER, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser. Z. Naturforsch. Ser. B. 7b, 148-155 (1952).

Anschrift für die Verfasser:

Dr. D. Berger
Abteilung für Allgemeinchirurgie
der Universität Ulm
Steinhövelstr. 9
7900 Ulm