

## DIN EN ISO 29701



ICS 07.030

**Nanotechnologien –  
Endotoxinprüfung an Proben aus Nanomaterial für In-vitro-Systeme –  
*Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Prüfung (LAL-Prüfung) (ISO 29701:2010);  
Deutsche Fassung EN ISO 29701:2010**

Nanotechnologies –  
Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems –  
*Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test (ISO 29701:2010);  
German version EN ISO 29701:2010

Nanotechnologies –  
Essai de détection d'endotoxines sur des échantillons de nanomatériaux pour des  
systèmes in vitro –  
Essai au lysat d'améboocyte de *Limule* (LAL) (ISO 29701:2010);  
Version allemande EN ISO 29701:2010

Gesamtumfang 27 Seiten

Normenausschuss Materialprüfung (NMP) im DIN

## Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 29701:2010) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 229 „Nanotechnologies“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 352 „Nanotechnologien“ erarbeitet. Beide Sekretariate werden vom BSI (Vereinigtes Königreich) gehalten.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Unterausschuss NA 062-08-17-03 UA „Gesundheits- und Umweltaspekte“ des Arbeitsausschusses NA 062-08-17 AA „Nanotechnologien“ im Normenausschuss Materialprüfung (NMP).

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| ISO 10993-12 | siehe DIN EN ISO 10993-12 |
| ISO 14644-1  | siehe DIN EN ISO 14644-1  |
| ISO 14644-2  | siehe DIN EN ISO 14644-2  |
| ISO 14644-7  | siehe DIN EN ISO 14644-7  |

## Nationaler Anhang NA (informativ)

### Literaturhinweise

DIN EN ISO 10993-12, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien*

DIN EN ISO 14644-1, *Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche — Teil 1: Klassifizierung der Luftreinheit*

DIN EN ISO 14644-2, *Reinraumräume und zugehörige Reinraumbereiche — Teil 2: Festlegungen zur Prüfung und Überwachung zum Nachweis der fortlaufenden Übereinstimmung mit ISO 14644-1*

DIN EN ISO 14644-7, *Reinräume und zugehörige Reinraumbereiche — Teil 7: SD-Module (Reinlufthauben, Handschuhboxen, Isolatoren und Minienvironments)*

Deutsche Fassung

Nanotechnologien —  
Endotoxinprüfung an Proben aus Nanomaterial  
für In-vitro-Systeme —  
*Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Prüfung (LAL-Prüfung)  
(ISO 29701:2010)

Nanotechnologies —  
Endotoxin test on nanomaterial samples  
for in vitro systems —  
*Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test  
(ISO 29701:2010)

Nanotechnologies —  
Essai de détection d'endotoxines sur des échantillons de  
nanomatériaux pour des systèmes in vitro —  
Essai au lysat d'améboocyte de *Limule* (LAL)  
(ISO 29701:2010)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 22. August 2010 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

## Inhalt

|                                                                                     | Seite     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort .....</b>                                                                | <b>3</b>  |
| <b>Einleitung.....</b>                                                              | <b>4</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich .....</b>                                                    | <b>5</b>  |
| <b>2 Begriffe .....</b>                                                             | <b>5</b>  |
| <b>3 Abkürzungen .....</b>                                                          | <b>6</b>  |
| <b>4 Betrachtungen im Vorfeld der Prüfung .....</b>                                 | <b>7</b>  |
| 4.1 Aufbewahrung von Nanomaterialien .....                                          | 7         |
| 4.2 Aufbewahrungsbehälter.....                                                      | 7         |
| 4.3 Handhabung der Nanomaterialien .....                                            | 7         |
| <b>5 Untersuchungsprobe .....</b>                                                   | <b>7</b>  |
| 5.1 Wässrige Dispersion .....                                                       | 7         |
| 5.2 Wässriger Extrakt .....                                                         | 7         |
| <b>6 Vorbereitung der Untersuchungsprobe .....</b>                                  | <b>7</b>  |
| 6.1 Dispersionsverfahren.....                                                       | 7         |
| 6.2 Extraktionsverfahren .....                                                      | 8         |
| 6.3 Konzentration.....                                                              | 8         |
| 6.4 Aufbewahrung der Untersuchungsprobe .....                                       | 8         |
| 6.5 Laborumgebung.....                                                              | 8         |
| <b>7 Prüfverfahren .....</b>                                                        | <b>9</b>  |
| 7.1 Kurzbeschreibung .....                                                          | 9         |
| 7.2 Alternative Prüfverfahren.....                                                  | 9         |
| 7.3 Auswahl und Validierung des Prüfverfahrens .....                                | 10        |
| 7.4 Versuchsabläufe .....                                                           | 11        |
| <b>8 Beurteilung der Ergebnisse .....</b>                                           | <b>11</b> |
| 8.1 Allgemeines .....                                                               | 11        |
| 8.2 Anleitung zur Anwendung der Prüfung.....                                        | 11        |
| <b>9 Prüfbericht.....</b>                                                           | <b>12</b> |
| <b>Anhang A (informativ) Beispiele potenzieller Störungen der LAL-Prüfung .....</b> | <b>13</b> |
| <b>Anhang B (informativ) Gel-Gerinnungsverfahren .....</b>                          | <b>14</b> |
| <b>Anhang C (informativ) Photometrisches Endpunkt-Bestimmungsverfahren .....</b>    | <b>18</b> |
| <b>Anhang D (informativ) Kinetisches Verfahren.....</b>                             | <b>21</b> |
| <b>Literaturhinweise .....</b>                                                      | <b>24</b> |

## **Vorwort**

Dieses Dokument (EN ISO 29701:2010) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 229 „Nanotechnologies“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 352 „Nanotechnologies“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom BSI gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis März 2011, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2011 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

### **Anerkennungsnotiz**

Der Text von ISO 29701:2010 wurde vom CEN als EN ISO 29701:2010 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

## Einleitung

Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) sind Bestandteil der Zellwand-Außenmembran von gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*. Endotoxine können eine Reihe systemischer Reaktionen in Säugetieren, einschließlich Menschen, hervorrufen, z. B. Fieber, disseminierte intravaskuläre Gerinnung (Verbrauchskoagulopathie), Blutdruckerniedrigung (Hypotonie), Kreislaufversagen und Tod: die Reaktionen werden durch die Produktion verschiedener Arten von Zytokinen, Aktivierung der Komplementkaskade, Aktivierung der Koagulationskaskade usw. indirekt bewirkt. Endotoxine sind in der gewöhnlichen Umwelt zu finden. Da die meisten für In-vivo- und In-vitro-Prüfsysteme vorgesehenen Nanomaterial-Untersuchungsproben vielfältige Vorbereitungsverfahren erfordern, können Endotoxine die für die Prüfung bestimmten Nanomaterialien verunreinigen, wenn die Proben ohne besondere Sorgfalt vorbereitet werden.

Für den Zweck der Toxizitäts-Vorfelddiagnostik oder Biokompatibilitätsprüfung von Nanomaterialien oder für die Mechanismus-Untersuchungen zu der von Nanomaterialien möglicherweise hervorgerufenen Giftigkeit werden derzeit verschiedene In-vitro-Prüfsysteme auf Zellbasis und In-vivo-Tiermodelle entwickelt und angewendet. In-vitro-Prüfsysteme, Makrophagen und andere relevante Säugetierzellen werden insbesondere für Nanomaterialien häufig als Prüfzellen verwendet, da sie die primär verantwortlichen Abwehrzellen im Körper sind. Diese Zellen sind jedoch gegenüber Endotoxinen äußerst reaktiv, weshalb es schwierig ist, die Reaktion auf Endotoxine von der auf Nanomaterialien zu unterscheiden. Demzufolge verfälschen Endotoxine die Ergebnisse von Prüfungen in vitro.

Verunreinigung von Untersuchungsproben durch Endotoxine kann vermindert werden, wenn geeignete Vorsichtsmaßnahmen bei der Vorbereitung der Untersuchungsprobe getroffen werden. Aus diesem Grund ist die Voruntersuchung auf Endotoxine erforderlich, um die Kontamination mit Endotoxinen zu minimieren oder unwesentliche Endotoxin-Konzentrationsniveaus in der Untersuchungsprobe zu bestätigen. Des Weiteren ist es wichtig, Endotoxine quantitativ zu bestimmen, um die durch biologische In-vitro-Prüfsysteme erhaltenen Daten angemessen interpretieren zu können.

Da Endotoxine Medizinprodukte und Medikamente für die parenterale Anwendung verunreinigen können, wurden quantitative und semiquantitative Untersuchungsverfahren zur In-vivo- und In-vitro-Bestimmung von Endotoxinen für behördliche Zwecke sowie als Laborstandardverfahren für Nanomaterialien entwickelt und angewendet (siehe Literaturhinweis [6]). Die Bakterien-Endotoxin-Prüfung mit einem *Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Reagenz (LAL) wurde als ein In-vitro-Prüfverfahren zur Prüfung auf Präsenz einer Endotoxinverunreinigung als Alternative zu Pyrogenizitätsprüfung mit Kaninchen entwickelt, und entsprechende Verfahren sind in der Pharmakopöe vieler Länder beschrieben.

Diese Internationale Norm enthält Ausführungen zur Anwendung der LAL-Prüfung auf Nanomaterial-Proben, die für biologische In-vitro-Prüfungen vorgesehen sind.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm beschreibt die Anwendung einer Prüfung mit einem *Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Reagenz (LAL) für die Evaluierung von Nanomaterialien, die für biologische In-vitro-Prüfsysteme auf Zellbasis bestimmt sind. Die Prüfung ist für die Anwendung mit in wässrigen Medien, z. B. Wasser, Serum oder Reaktionsmedium, dispergierten Nanomaterialproben geeignet und für derartige Medien, die für eine angemessene Dauer bei 37 °C mit Nanomaterialien inkubiert wurden.

Diese Internationale Norm ist auf Prüfobjekte für In-vitro-Systeme beschränkt, jedoch können die Verfahren auch an Nanomaterialien angepasst werden, die Tieren auf parenteralen Wegen zugeführt werden.

## 2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

### 2.1

#### Koagulogen

koagulierfähiges Protein (Proteinvorläufer) in LAL, das bekanntlich eine zentrale Rolle in der Gelklumpenbildung durch Endotoxine spielt

ANMERKUNG Aus dem Japanischen Pfeilschwanzkrebs (*Tachypleus tridentatus*) gewonnenes Koagulogen besteht aus insgesamt 175 Aminosäuren mit der relativen Molekülmasse von 19 723 (siehe Literaturhinweis [7]).

### 2.2

#### Koagulin

resultierende Fragmente des Koagulogens nach begrenzter Proteolyse (Eiweißspaltung) des Gerinnungsenzyms in LAL

ANMERKUNG Ein aus dem Japanischen Pfeilschwanzkrebs (*Tachypleus tridentatus*) gewonnenes Koagulin besteht aus N-terminalen Fragmentpeptiden (Ala1-Arg18) und C-terminalen Fragmentpeptiden (Gly47-Phe175) (siehe Literaturhinweis [7]).

### 2.3

#### Endotoxin

Teil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien

ANMERKUNG Der aktive Hauptbestandteil sind Lipopolysaccharide (LPS).

### 2.4

#### Endotoxin-Einheit

EU

Standardeinheit der Endotoxinaktivität

ANMERKUNG1 Die Endotoxineinheit wurde vom „Expert Committee on Biological Standardization“ (ECBS, Fachausschuss für biologische Normung) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1996 relativ zur Aktivität von 0,1 ng des WHO-Referenz-Standard-Endotoxins (RSE) von *Escherichia coli* 0113:HK10:K(–) oder 10 EU/ng definiert (siehe Literaturhinweis [8]).

ANMERKUNG 2 EU ist gleich der internationalen Einheit (IU) von Endotoxin.

### 2.5

#### Lambda

$\lambda$

ausgewiesene Empfindlichkeit des LAL für das Gelgerinnungs-Verfahren oder die geringste Endotoxin-Konzentration der Standardkurve für chromogene oder turbidimetrische Verfahren, angegeben in EU/ml

## 2.6

### **Limulus-Amoebocyten-Lysat**

LAL

wässriges Extrakt der Blutkörperchen von Pfeilschwanzkrebsen der Art *Limulus polyphemus* oder *Tachypleus tridentatus*

## 2.7

### **Limulus-Amoebocyten-Lysat-Prüfung**

#### **LAL-Prüfung**

Prüfung zum Messen von Bakterien-Endotoxinen mit *Limulus*-Amoebocyten-Lysat-Reagenz

ANMERKUNG In der Pharmakopöe wird die LAL-Prüfung „Bakterien-Endotoxin-Prüfung (BET)“ genannt.

## 2.8

### **optische Dichte**

OD

optisches Absorptionsvermögen eines optischen Elements bei einer bestimmten Wellenlänge je Längeneinheit

## 2.9

### **Untersuchungsprobe**

wässrige Dispersion oder wässriges Extrakt von zu untersuchenden Nanomaterialien

## 3 Abkürzungen

|      |                                                                                            |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| BET  | Bakterien-Endotoxin-Prüfung (en: bacterial endotoxin test)                                 |
| CSE  | Kontrollstandard-Endotoxin (en: control standard endotoxin)                                |
| ECBS | Fachausschuss für biologische Normung (en: expert committee on biological standardization) |
| EF   | endotoxinfrei                                                                              |
| EU   | Endotoxin-Einheit (en: endotoxin unit)                                                     |
| I/EC | Inhibitions-/Verstärkungskontrolllösung (en: inhibition/enhancement control)               |
| LAL  | <i>Limulus</i> -Amoebocyten-Lysat                                                          |
| LPS  | Lipopolysaccharid                                                                          |
| OD   | optische Dichte                                                                            |
| RSE  | Referenz-Standard-Endotoxin                                                                |
| WHO  | Weltgesundheitsorganisation (en: World Health Organization)                                |

## 4 Betrachtungen im Vorfeld der Prüfung

### 4.1 Aufbewahrung von Nanomaterialien

Nanomaterialien können auf Grund ihrer großen Oberfläche viele Verunreinigungen, einschließlich Endotoxine, aus der Umgebung aufnehmen. Deshalb müssen Nanomaterialien ab dem Eingang bis zur Verwendung in endotoxinfreien, verschließbaren Behältern (z. B. Glasbehälter) aufbewahrt werden. Zum Nachweisen des Nichtvorhandenseins einer Endotoxinverunreinigung müssen geeignete Blindproben wie endotoxinfreie Metalloxidpulver wie Titanoxid, Siliciumdioxid, usw. verwendet werden.

ANMERKUNG 1 Es ist ratsam, dass Kunststoffe wie Polypropylen auf Grund der möglichen Störung der LAL-Prüfung, wie in Anhang A beschrieben, für die Aufbewahrung von Nanomaterialien vermieden werden.

ANMERKUNG 2 Endotoxinfreie Metalloxidpulver können durch Wärmebehandlung erhalten werden (siehe 4.2).

### 4.2 Aufbewahrungsbehälter

Glasbehälter und andere hitzebeständige Aufbewahrungsbehälter für die Aufbewahrung von Nanomaterialien und Untersuchungsproben sollten zur Beseitigung von Endotoxinen durch mindestens 30-minütiges Erhitzen auf eine Temperatur über 250 °C oder andere validierte Kombinationen aus Temperatur und Zeit (z. B. 180 °C für mindestens 3 h oder 650 °C für 1 min) behandelt werden. Im Handel erhältliche, sterile endotoxinfreie Behälter können verwendet werden.

### 4.3 Handhabung der Nanomaterialien

Der in Innenraumumgebungen anzutreffende Staub enthält üblicherweise beträchtliche Mengen an Endotoxinen. Besondere Aufmerksamkeit muss der Vermeidung des Kontakts zwischen Staub und Nanomaterialien während der Probenahme und Handhabung gewidmet werden. Bezüglich der Laborluft sind Bedingungen wie im Reinraum erforderlich (empfohlen in 6.5).

## 5 Untersuchungsprobe

### 5.1 Wässrige Dispersion

Nanomaterialien, die in wässriger Flüssigkeit dispergiert sind, können der LAL-Prüfung direkt oder nach Verdünnung mit endotoxinfreiem Wasser unterzogen werden.

### 5.2 Wässriger Extrakt

Endotoxinfreies Reaktionsmedium, physiologische Salzlösung oder andere Extraktionsmittel, die mit Nanomaterialien inkubiert sind, können als Untersuchungsprobe für die LAL-Prüfung verwendet werden.

## 6 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

### 6.1 Dispersionsverfahren

Die Prüfdispersionen können auf eine oder mehrere der folgenden Arten hergestellt werden:

- Mörsern von Hand,
- mechanisches Mahlen;
- Ultraschallbehandlung.