



sartorius stedim
biotech

Ultrasart[®]-System

Directions for Removal of Interfering
Substances for the LAL Test Using Pressure
System 16506 and Disposable
Ultrafiltration Unit 16520

Gebrauchsanleitung zur Trennung
von Störsubstanzen des LAL-Tests
mit dem Drucksystem 16506 und der
Einweg-Ultrafiltrationseinheit 16520



82351-000-65

English – page 3

Before reading these instructions, fold out the last page containing the photos.

Deutsch – Seite 14

Bitte klappen Sie vor dem Lesen die letzten Seiten mit den Abbildungen auf.

Contents

1. Introduction
 - 1.1. References
2. Ultrasart System for Removal of Substances that Interfere with the LAL Test
 - 2.1. Principle and Function; Additional Applications
 - 2.2. Equipment Supplied
 - 2.3. Specifications
 - 2.4. Directions
3. Accessories
4. Spare Parts

1. Introduction

Many pharmaceuticals are required to be validated or tested for the absence of bacterial endotoxins (pyrogens; lipopolysaccharides: LPS) before they may be released. Currently, there are two known methods permitted for the detection of endotoxins (pyrogens):
a) in vivo test: rabbit pyrogen test
b) in vitro test: LAL test (Limulus Amebocyte Lysate) which is mainly used for in-process control at present.

The introduction of the LAL test as a pyrogen detection method for pharmaceutical and medical products is still difficult and limited. These limitations can be attributed to the susceptibility of the test to numerous interfering factors. Interfering factors are substances which distort the test results (false negative or false positive); thus, inhibitors are substances that inhibit the reaction with LAL enzymes despite the presence of endotoxins (LPS):
LAL + LPS → gel-clot formation (this reaction is the basis for this detection method).

LPS + LAL + inhibitors → no gel-clot formation

These false results erroneously lead us to believe that the product is pyrogen-free. Activators are enhancing substances that do not possess any pyrogenic properties but do react with LAL enzymes, resulting in gel-clot formation:

LAL+ activators (nonpyrogens) → gel-clot formation

The presence of pyrogens is simulated in the process. The degree of such inhibition or enhancement depends, among other things, upon the kind and concentration of these substances as well as upon the concentration of the pyrogens. The purity and the quality of the LAL reagent used also play a substantial role in this case. Each of the methods just stated for the detection of pyrogens has advantages and disadvantages. The LAL method has the following advantages over the rabbit pyrogen test:

1. Provides quantitative results
2. Faster
3. In vitro test (no need for experimental animals, a test feature welcomed by animal protection agencies!)
4. Can be done in any laboratory (microbiology, biochemistry, pharmacy, clinical chemistry)
5. Economy-priced test kits
6. Can be performed by any person trained to do the test
7. Specific for bacterial endotoxins (this group accounts for more than 90% of the pyrogens encountered in the pharmaceutical field)

The disadvantages of the LAL test in comparison to the rabbit test are:

1. Can only be done in a pH range of 6-8
2. Is affected by interfering substances
3. Other pyrogenic substances are not detectable

It is precisely the first two factors (pH and interfering substances) which can be eliminated by using the Ultrasart D20, thereby making it possible to use the LAL test.

1.1. References

The categories given below have been described in reference literature as substances interfering with the LAL test:

1. antibiotics
2. hormones
3. salts
4. amino acids
5. alkaloids
6. cellulose derivatives
7. some sugar molecules
8. pH range <6 and >8
9. plasma proteins
10. protein-degrading enzymes
11. nucleotide compounds

The following bibliography should be considered only a small selection of the comprehensive literature available on this subject.

1. Elin, R.J. and Wolff, S. M.: "Nonspecificity of the Limulus Amebocyte Lysate Test: Positive Reactions with Polynucleotides and Proteins." *Journal of Infectious Diseases*, Vol.128, (1973)
2. Enver Izgü et al.: "A continuation on the application of the Limulus test for demonstrating the absence of pyrogenicity in saline and dextrose solutions prepared in hospitals" *J. of Clin.: Pharm.*1,129-135 (1976)
3. Guilfoyle, D.E. and Munson, T. E.: Procedures for Improving Detection of Endotoxin in Products Found Incompatible for Direct Analysis with Limulus Amebocyte Lysate; in: Watson, S., Levin, J., Novitsky, T. J. (eds.) "Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test" 79-90 (1982): Alan R. Liss Inc.
4. Krüger, D.: Der Pyrogennachweis mittels des Limulustests - Methoden, Ergebnisse, Möglichkeiten und Grenzen eines in-vitro-Tests; *Pharm. Industrie* 43, 1 (1981) (Detection of pyrogens by means of the LAL test methods, results, possibilities and limitations of an in vitro test)
5. Krüger, D. et al.: "Ein Beitrag zur in-vitro-Pyrogenprüfung mittels des Limulus-Tests"; *Drug Res.*25, No. 2 160-172 (1975)
6. Levin, J. Bang, F.B.: "Clotting Proteins in Limulus: Its Localisation and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin." *Throm. Diath. Haemorrh.*19,186, (1968)
7. Mikami, T. et al.: Gelation of Limulus Amebocyte Lysate by Simple Polysaccharides; *Microbio. Immunol.* vol. 26 (5): 403-409 (1982)
8. Morita, T. et al.: A new (1 → 3) β-D-glycan-mediated coagulation pathway found in Limulus amebocytes; *FEBS Letters* 129, 318-321 (1981)
9. Pearson, F. C., et al.: Characterization of Limulus Amebocyte Lysate-Reactive Material from Hollow Fiber Dialysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1189-1196, (1984).
10. Pfeiffer, M., Weiss, A.R.: Removal of LAL-test interfering low molecular weight substances by ultrafiltration. In: Watson, S., Levin, J., Novitsky, T. J. (eds.): "2nd International Conference on Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test." Alan R. Liss Inc., NewYork, in press. (1986).
11. Pfeiffer, M., Weiss, A.R. Koppensteiner, G.: Die Ausschaltung von Störsubstanzen des LAL-Tests durch Ultrafiltration: *Pharm. Ind.* 47, 311-314, (1985).

12. Reinhold, R. et al.: "A Technique for Quantitative Measurement of Endotoxin in Human Plasma." Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.137 (1971).
13. Sullivan, J.D., Watson, S.: Factors affecting the sensitivity of Limulus Lysate. App. Microbiol. 28, 1023-1026, (1974).
14. The United States Pharmacopoeia XXI. Mack Publishing Co., Easton P.A. 1165 (1985).
15. Thowy, C.W., Duran, A.P., Munson, T.E.: Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the Limulus Amebocyte Lysate Method. J. Parenter. Sci. Technol. 38, 190-201, (1984).
16. Wildfeuer, A. et al.: "Investigations in the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin." Appl. Microbiol. 28, 867-871 (1974).
17. Zimmermann, G., Kilz, R., Krüger, D.: Entfernung störender Substanzen durch Einweg-Ultrafilter bei der Endotoxinbestimmung mittels Limulustests. Pharm. Ind. 47, 647-651, (1985).
18. Zimmermann, G.: Störende Substanzen bei der Endotoxinbestimmung mittels Limulustest und Möglichkeiten ihrer Ausschaltung. Pharm. Ind. 47, 203-207, (1985).
19. Weiss, A.R.: A new ultrafiltration unit for the removal of substances interfering with the LAL Endotoxin-Test. In: Watson, S., Levin, J., Novitsky, T.J. (eds): "2nd International Conference on Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test." Alan R. Liss Inc., New York, in press (1986).

2. Ultrasart System for Removal of Substances that Interfere with the LAL Test

2.1. Principle and Function

In general, pyrogens have a high molecular weight (ranging from 10,000 to a few million - depending on the type and medium) in comparison to that of interfering substances (antibiotics, hormones, alkaloids, salts, radiopharmaceuticals, a few sugar molecules, acidic or alkaline amino acid solutions) described in literature. By continuously rinsing with pyrogen-free solution (buffer, NaCl, I.V. solution or other liquids) with the aid of the Ultrasart D20 Ultrafiltration Unit (sterile and nonpyrogenic), interfering substances of low molecular weight compounds can be flushed out and pyrogenic, high molecular weight compounds, i.e. endotoxins, retained and concentrated. After homogenizing the sample, the required sample volumes can be collected for the LAL test.

The Ultrasart System

- is completely pyrogen-free as required by the LAL method
- is free of substances interfering with the LAL test
- permits complete retention of endotoxins on the filter
- provides excellent flow rates at an operating pressure ranging from 1 to 2 bar
- has minimum adsorptive effects

Additional applications

for the Ultrasart system include:

1. Depyrogenation of small volumes (filtrate)
2. Deproteinization for applications in biochemistry, clinical chemistry, and in analysis
3. Concentration of viruses in liquids
4. Concentration of proteins in dilute solutions
5. Dialysis procedures (desalting)
6. Adjustment of a specimen's pH
7. Concentration of bacteria and their detection
8. Flushing out of substances harmful to bacteria (disinfectants, antibiotics)

2.2. Equipment Supplied

The system consists of:

a) A pressure system 16506 (Fig. 1) comprising the following components:

- 16665 pressure manifold
- 16663 pressure tank
- 16664 pressure hose
- 16698 hose for tank-to-manifold connection
- 171 64 rack for Ultrasart D 20

b) The other part of this product is a disposable ultrafiltration unit:

Ultrasart D20, 16520C (Fig. 2)

A standard package contains 6 individually sealed, presterilized and nonpyrogenic ultrafiltration units, each supplied with cap and plug.

2.3. Specifications

A) Pressure system 16506

A1 - Pressure manifold 16565

Material:	Stainless steel
Stand:	Chrome-plated brass
Weight:	3,000 g
Connections:	Adapter for quick connect coupling
Valves:	taps
Max. operating pressure:	4 bar 58 psi
Heat resistance:	180-200 °C
Gaskets:	Silicone

A2 - Pressure tank 16663

Material:	Stainless steel
Capacity:	3 l
Max. press. resistance:	4 bar 58 psi
Height:	22 cm
Outer diameter:	20 cm
Weight:	2,660 g
Connections:	adapters for quick connect coupling
Gasket:	viton O-ring
Pressure gauge:	max. T 121 °C
Heat resistance:	(without pressure gauge) 180 °C-200 °C

A3 – Hose for tank-to-manifold connection 16698

Material:	PTFE stainless steel reinforced hose
Connections:	quick-connect coupling
Length:	800 mm
Weight:	432 g
Max. pressure:	5 bar 72.5 psi
Heat resistance:	180 °C-200 °C

A4 – Pressure hose 16664

Material:	Tombac braided tubing
Connections:	1 quick-connect coupling and R3/8" threaded nut with nipple
Length:	1,000 mm
Weight:	213 g
Max. pressure:	5 bar 72.5 psi
Heat resistance:	180 °C-200 °C

B) Disposable ultrafiltration unit 16520 C

Housing material: Upper part: Polyman SAN,

Filter table: MBS-Cyrolite.

The incorporated ultrafilter is a 14549 (cellulose triacetate) filter with a cutoff of 20,000.

- weight (without cap and plug)	12 g
- filtration area	5.30 cm ²
- max. capacity	15 ml
- hold-up volume	0.04 ml
- recommended operating pressure	1-2 bar 14.5-29 psi
- max. temperature	50 °C
- pH compatibility	compatible at 4-8
- amino acids (all) 1 M/2 hr	compatible
- bases (e.g. NaOH) 0.1 N/2 hr	compatible
- acids (e.g. HCl) 0.1 N/2 hr	compatible
- retention of bovine serum albumin	97-99%
- adsorption	very negligible
- sterility	presterilized with ETO (ethylene oxide)
- pyrogenicity	rabbit test: free of pyrogens LAL test: free of pyrogens
- pyrogen retention	100%
- time required for 10-fold concentration of a bovine serum albumin solution (initial volume of 10 ml at 1.5 bar 21.75 psi)	
1% to 10%:	40 min.
0.1% to 1%:	15 min.

Disposable ultrafiltration unit – cont.

- The time it takes to rinse an aqueous sample to remove amino acids, antibiotics, etc., under actual-use conditions is between 15-30 min. on the average (depending on the type of the substance and concentration as well as pressure).
- flow rate for water: 2 ml/min. at 100 kPa (1 bar | 14.5 psi)

2.4. Directions for Removal of Substances Interfering with the LAL Test

1. Depyrogenate the assembled pressure system (pressure tank without pressure gauge with dry heat at 180 °C for 4 hours or at 200 °C for 2 hours, as shown in Fig. 3. Leave the taps open.
2. As soon as the pressure tank has cooled off, fill it with pyrogen-free solution while maintaining aseptic conditions.
3. Remove the number of presterilized, pyrogen-free packaged disposables required for your test from the box.
4. Starting at the lower corner, peel off the protective backing from the blister.
5. Remove a disposable unit from its package and plug the outlet using the rubber plug provided (Fig. 4).
6. Flush each disposable twice using 10 ml of pyrogen-free solution each time (0.9% NaCl, H₂O, I.V. solution or buffer). To do so, place the disposables filled with pyrogen-free solution briefly on a laboratory shaker (Vibrofix, Whirlmix etc.) and then pour out the solution.
7. Using pyrogen-free pipettes, fill the disposables with the samples to be tested (2-6 ml).
8. Screw the disposable units onto the pressure manifold counterclockwise, and place glass beakers below each disposable to collect the filtrate (Fig. 5). Connect the system components in the following order: pressure source | pressure hose 16664 | pressure manifold | Ultrasart D20.
 - 8.1 Remove the rubber plugs.
 - 8.2 Open the valve of the pressure source and the taps on the pressure manifold; filter the samples at 1-2 bar | 14.5-29 psi but not until “the very last drop.” As soon as a sample is almost completely filtered, close the corresponding tap on the pressure manifold.
 - 8.3 Upon completion of the filtration run, close the valve of the pressure source.
 - 8.4 Release the pressure in the system so that it drops to 0 bar by briefly untightening the valve on the pressure manifold and immediately retightening it. (Fig. 6).

9. To completely remove any remaining substances that interfere with the LAL test, post-rinse the disposables by connecting the pressure tank containing the rinse solution. (Connection sequence: pressure source | pressure hose 16664 | pressure tank | hose 16698 | pressure manifold | Ultrasart D20 (Fig. 7). Fill the pressure tank with the required volume of rinse solution (determine in a preliminary trial run). Open the valve on the pressure source and, with the taps closed on the pressure manifold, evacuate the air from the pressure hose and manifold by slightly opening the valve on the pressure manifold until liquid escapes. Now open the taps on the manifold. If the amount of rinse solution flowing into the Ultrasart D 20 disposables is insufficient, loosen each disposable (by slightly turning each one clockwise) until the volume of available rinse solution is at least equal to that of the sample previously filtered.

10. Upon completion of the rinse procedure, add liquid to obtain the initial volume of the sample (e.g. add pyrogen-free solution to the retentate in the disposables in order to fill them up to the original sample volume).

11. Cap and plug the Ultrasart D20, and homogenize the liquid in the Ultrasart on a laboratory shaker for 30-60 sec. Afterwards, perform the pyrogen test according to the particular lysate manufacturer's instructions.

12. After rinsing, clean the stainless steel unit with water, dry, and sterilize or depyrogenate it. To generate sterile compressed gas or air, we recommend using filter holder 16254 with a PTFE filter. (Fig. 8)

In order to be able to connect 16254 to the pressure system, the following connectors are required:

17089 stainless steel connector, M 12 × 1 male thread | R3/8" male thread

16664 pressure hose, R3/8" threaded nut with nipple | quick-connect coupling

17069 stainless steel connector, M 12 × 1 male thread | R3/8" threaded nut

Important

Please note the following:

1. Make sure the filter does not dry out during and after filtration | rinsing (do not allow to remain under pressure for longer periods without liquid).
2. After filtration and rinsing, the sample must be homogenized 30-60 seconds on a laboratory shaker (e.g., Vibrofix or similar) and immediately used for the LAL test. If there is any delay in pipetting the appropriate sample volumes, the sample(s) must be reshaken on a laboratory shaker.
3. If the filtrate is to be used, the underside of the filter (outlet) must be rinsed free of any pyrogens by filtering approx. 10 ml of rinse liquid through the disposables.

3. Accessories for the Pressure System

- 16223** stainless steel pressure filter holder
- 16254** stainless steel in-line filter holder, 47 mm
- 17069** stainless steel connector, M 12 × 1 male thread | R3/8" threaded nut
- 17089** stainless steel connector, M 12 × 1 male thread | R3/8" male thread
- 17152** adapter with quick-connect coupling on both ends
- 17153** screw-on nipple for adapter with quick-connect couplings
- 17161** connector, R3/8" male thread | Luer lock
- 16240** stainless steel pressure filter holder (PTFE-coated)

4. Spare Parts

4.1. For the pressure tubing

6985128 quick-connect coupling

4.2. For the pressure manifold

6985133 valve with connector and gasket

6985127 gaskets

6985132 connector (for valve)

6980274 O-ring, silicone, 8 × 2 mm

4.3. For the pressure tank

6986029 screw-on nipple

6985131 cap

6980145 pressure gauge, 5 bar

6980389 viton O-ring, 85 × 5 mm

6980396 viton O-ring, 7.5 × 2.5 mm

6986129 lid with valve

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1. Literaturhinweis
2. Ultrasart-System zur Trennung von LAL-Test störenden Substanzen
 - 2.1. Prinzip und Funktion; weitere Anwendungen
 - 2.2. Lieferumfang
 - 2.3. Technische Daten
 - 2.4. Bedienungsanweisung
3. Zubehör
4. Ersatzteile

1. Einleitung

Voraussetzung für die Freigabe einiger pharmazeutischer Produkte ist ihre Prüfung auf das Nichtvorhandensein bakterieller Endotoxine (Pyrogene; Lipopolysaccharide: LPS). Zur Zeit sind zwei Methoden zum Nachweis von Endotoxinen (Pyrogenen) bekannt und zulässig:

a) In vivo-Test: Kaninchentest

b) In vitro-Test: LAL-Test (Limulus-Amebocyte Lysate), derzeit hauptsächlich für die In-Prozess Kontrolle.

Die Einführung des LAL-Tests als Pyrogennachweis für pharmazeutische und medizinische Produkte wird immer noch erschwert und eingeschränkt. Diese Einschränkungen sind auf die Anfälligkeit des Tests durch zahlreiche Störfaktoren zurückzuführen. Störfaktoren sind Stoffe, die das Testergebnis verfälschen (zum Negativen oder zum Positiven); so sind Inhibitoren Stoffe, die trotz Anwesenheit von Endotoxinen (LPS) die Reaktion mit LAL-Enzymen hemmen:

LAL + LPS → Gelbildung (diese Reaktion ist der Basisnachweis dieser Methode)

LPS + LAL + Inhibitoren → keine Gelbildung. Diese falschen Ergebnisse täuschen eine Pyrogenfreiheit vor! Aktivatoren sind Stoffe, die keine Pyrogeneigenschaften besitzen, jedoch mit LAL-Enzymen reagieren und zur Gelbildung führen:

LAL + Aktivatoren (keine Pyrogene) → Gelbildung

Hierbei wird eine Pyrogenanwesenheit vorgetäuscht!
Die Stärke dieser Hemmung bzw. Stimulierung hängt unter anderem von Art und Konzentration dieser Stoffe sowie von der Konzentration der Pyrogene ab. Auch die Reinheit und die Qualität des eingesetzten LAL's spielt hier eine große Rolle. Jede der obengenannten Methoden zum Nachweis von Pyrogenen hat Vor- und Nachteile. Die LAL-Methode hat im Vergleich zum Kaninchentest folgende Vorteile:

1. Quantitative Ergebnisse.
2. Schneller.
3. In-vitro-Test (Tierschutz!).
4. Kann in jedem Labor (Mikrobiologie, Biochemie, Pharmazie, klinische Chemie) durchgeführt werden.
5. Preisgünstig.
6. Kann von jeder angelernten Person durchgeführt werden.
7. Spezifisch für bakterielle Endotoxine (diese machen mehr als 90% der im Pharmabereich auftretenden Pyrogene aus).

Die Nachteile des LAL-Tests im Vergleich zum Kaninchentest sind:

1. Nur in einem pH-Bereich von 6-8 durchführbar.
2. Wird durch Störsubstanzen beeinflusst.
3. Andere Pyrogensubstanzen können nicht erfasst werden.

Gerade die ersten beiden Faktoren (pH-Wert und Störsubstanzen) können mit Ultrasart D20 ausgeschaltet werden, und damit wird der Einsatz des LAL-Tests ermöglicht.

1.1. Literaturhinweis

Aus der Literatur sind folgende Stoffklassen als Störsubstanzen für den LAL-Test beschrieben worden:

1. Antibiotika
2. Hormone
3. Salze
4. Aminosäuren
5. Alkaloide
6. Cellulose-Derivate
7. einige Zuckermoleküle
8. pH < 6 und > 8
9. Plasmaproteine
10. proteinabbauende Enzyme
11. Nucleotid-Verbindungen

Die beigefügte Referenzliste soll nur als eine kleine Auswahl aus diesem Gebiet angesehen werden.

1. Elin, R.J. and Wolff, S.M.: „Nonspecificity of the Limulus Amebocyte Lysate Test: Positive Reactions with Polynucleotides and Proteins.” *Journal of Infectious Diseases*, Vol.128, (1973)
2. Enver Izgü et al.: „A continuation on the application of the Limulus test for demonstrating the absence of pyrogenicity in saline and dextrose solutions prepared in hospitals” *J. of Clin.: Pharm.* 1, 129-135 (1976)
3. Guilfoyle, D. E. and Munson, T. E.: Procedures for Improving Detection of Endotoxin in Products Found Incompatible for Direct Analysis with Limulus Amebocyte Lysate; in: Watson, S., Levin, J., Novitsky, T. J. (eds.) „Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test” 79-90 (1982): Alan R. Liss Inc.
4. Krüger, D.: Der Pyrogennachweis mittels des Limulus-tests - Methoden, Ergebnisse, Möglichkeiten und Grenzen eines in-vitro-Tests; *Pharm. Industrie* 43, 1 (1981)
(Detection of pyrogens by means of the LAL test - methods, results, possibilities and limitations of an in vitro test)
5. Krüger, D. et al.: „Ein Beitrag zur in-vitro-Pyrogenprüfung mittels des Limulus-Tests”; *Drug Res.* 25 No. 2 160-172 (1975)
6. Levin, J. Bang, F.B.: „Clotting Proteins in Limulus: Its Localisation and Kinetics of Its Coagulation by Endotoxin.” *Throm. Diath. Haemorrh.* 19,186, (1968)
7. Mikami, T. et al.: Gelation of Limulus Amebocyte Lysate by Simple Polysaccharides; *Microbio. Immunol.* vol. 26 (5): 403-409 (1982)
8. Morita, T. et al.: A new (1 → 3) β-D-glycan mediated coagulation pathway found in Limulus amebocytes; *FEBS Letters* 129, 318-321 (1981)
9. Pearson, F.C., et al.: Characterization of Limulus Amebocyte Lysate-Reactive Material from Hollow Fiber Dialysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1189–1196, (1984).
10. Pfeiffer, M., Weiss, A. R.: Removal of LAL-test interfering low molecular weight substances by ultra-filtration. In: Watson, S., Levin, J., Novitsky, T.J. (eds.): „2nd International Conference on Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test.” Alan R. Liss Inc., New York, in press. (1986).
11. Pfeiffer, M., Weiss, A.R. Koppensteiner, G.: Die Ausschaltung von Störsubstanzen des LAL-Tests durch Ultrafiltration: *Pharm. Ind.* 47, 311-314, (1985).

12. Reinhold, R. et al.: „A Technique for Quantitative Measurement of Endotoxin in Human Plasma.” Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol.137 (1971).
13. Sullivan, J.D., Watson, S.: Factors affecting the sensitivity of Limulus Lysate. Appl. Microbiol. 28, 1023-1026, (1974).
14. The United States Pharmacopoeia XXI. Mack Publishing Co., Easton P.A. 1165 (1985).
15. Thowy, C.W., Duran, A.P., Munson, T.E.: Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the Limulus Amebocyte Lysate Method. J. Parenter. Sci. Technol. 38, 190-201, (1984).
16. Wildfeuer, A. et al.: „Investigations in the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin.” Appl. Microbiol. 28, 867-871 (1974).
17. Zimmermann, G., Kilz, R., Krüger, D.: Entfernung störender Substanzen durch Einweg-Ultrafilter bei der Endotoxinbestimmung mittels Limulustests. Pharm. Ind. 47, 647-651, (1985).
18. Zimmermann, G.: Störende Substanzen bei der Endotoxinbestimmung mittels Limulustest und Möglichkeiten ihrer Ausschaltung. Pharm. Ind. 47, 203-207, (1985).
19. Weiss, A.R.: A new ultrafiltration unit for the removal of substances interfering with the LAL Endotoxin-Test. In: Watson, S., Levin, J., Novitsky, T.J. (eds): „2nd International Conference on Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test.” Alan R. Liss Inc., New York, in press (1986).

2. Abtrennung von LAL-Test störenden Substanzen

2.1. Prinzip und Funktion

Pyrogene haben im allgemeinen ein hohes Molekulargewicht (von 10.000 bis zu einigen Millionen – abhängig von Art und Medium) im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Störsubstanzen (Antibiotika, Hormone, Alkaloide, Salze, Radiopharmaka, einige Zuckermoleküle, saure oder alkalische Aminosäurelösungen). Durch eine kontinuierliche Spülung mit pyrogenfreier Lösung (Puffer, NaCl, Infusionslösung oder andere) mit Hilfe der Ultrasart D20-Filtereinheit (steril und pyrogenfrei) können die Störsubstanzen niedermolekularer Verbindungen ausgespült und die pyrogenen hochmolekularen Verbindungen – also Endotoxine festgehalten bzw. eingengt werden. Nach einer Homogenisierung der Probe können die benötigten Volumina für den LAL-Test entnommen werden.

Das Ultrasart-System

- bietet Pyrogenfreiheit nach der LAL-Methode
- ist frei von den LAL-Test störenden Substanzen
- erlaubt die vollständige Retention der Endotoxine im Rückstand
- gewährleistet gute Flussraten bei einem Arbeitsdruck von 1 bis 2 bar.
- besitzt minimale Adsorptionseffekte

Weitere mögliche Anwendungen

des Systems sind:

1. Entpyrogenisierung von kleinen Mengen (Filtrat).
2. Entproteinisierung in der Biochemie, der klinischen Chemie und der Analytik.
3. Konzentrierung von Viren in Flüssigkeiten.
4. Konzentrierung von Proteinen in dünnen Lösungen.
5. Dialyse-Vorgänge (Spülung von Salzen).
6. Umpuffern einer Probe.
7. Konzentrierung von Bakterien und ihr Nachweis.
8. Auswaschen von bakteriellen Schadstoffen (Desinfektionsmittel, Antibiotika).

2.2. Lieferumfang

Das System besteht aus:

a) einem Drucksystem 16506 (Abb.1)

dies umfasst folgendes:

16665 Druckleiste

16663 Druckbehälter

16664 Druckschlauch

16698 Verbindungsschlauch

17164 Halterung für Ultrasart D20

b) Der andere Teil dieses Produkts ist eine Disposable-

Ultrafiltrationseinheit: Ultrasart D20, Bestellnummer

16520 C (Abb. 2)

Eine Normpackung besteht aus 6 Stück einzeln steril und pyrogenfrei verpackten UF-Einheiten mit Kappen und Stöpseln.

2.3. Technische Daten

A) Drucksystem 16506

A1 - Druckleiste 16565

Material:	Edelstahl
Ständer:	Messing verchromt
Gewicht:	3000 g
Anschlüsse:	Anschlussstück für Schnell- verschlusskupplung
Ventile:	Kükenventile
max. Betriebsdruck:	4 bar
Hitzebeständigkeit:	180-200 °C
Dichtungen:	Silikon

A2 - Druckbehälter 16663

Material:	Edelstahl
Fassungsvermögen:	3 l
max.	
Druckbelastung:	4 bar
Höhe:	22 cm
Außendurchmesser:	20 cm
Gewicht:	2660 g
Anschlüsse:	Anschlussstücke für Schnell- verschlusskupplung
Dichtung:	Viton-O-Ring
Manometer:	T max. 121 °C
Hitzebeständigkeit:	(ohne Manometer) 180 °C-200 °C

A3 – Verbindungsschlauch 16698 Material

Material:	Edelstahlarmierter PTFE-Schlauch
Anschlüsse :	Schnellverschlusskupplung
Länge:	800 mm
Gewicht:	432 g
max. Druck:	5 bar
Hitzebeständigkeit:	180 °C-200 °C

A4 – Druckschlauch 16664

Material:	Tombakwellrohrschlauch
Anschlüsse :	Schnellverschlusskupplung u. R3/8” Überwurfmutter mit Dichtkegel
Länge :	1,000 mm
Gewicht :	213 g
max. Druck :	5 bar
Hitzebeständigkeit :	180 °C-200 °C

B) Einweg Ultrafiltrationseinheit 16520 C

Gehäusematerial:

Oberteil: Polyman SAN, Filtertisch: MBS-Cyrolite.

Das eingebaute Ultrafilter ist 14549 (Cellulosetriacetat) mit cut off 20000.

- Gewicht (ohne Kappe und Stöpsel)	12 g
- Filtrationsfläche	5,30 cm ²
- Volumeninhalt	15 ml
- Totvolumen	0,04 ml
- Empfohlener Arbeitsdruck	1-2 bar
- Max. Temperatur	50 °C
- pH-Beständigkeit	pH 4-8 beständig
- Aminosäure (alle) 1 M/2 Std.	beständig
- Lauge (NaOH) 0,1 N/2 Std.	beständig
- Säure (HCl) 0,1 N/2 Std.	beständig
- Retention von Rinderserumalbumin	97-99%
- Adsorption	sehr gering
- Sterilität	steril durch Äthylenoxid- Begasung
- Pyrogenität	Kaninchentest: frei LAL-Test: frei
- Pyrogenretention	100%
- Zeit für die 10fache Konzentrierung einer Rinderserumalbuminlösung (Ausgangsvolumen 10 ml bei 1,5 bar)	
1% auf 10%:	40 Min.
0,1% auf 1%:	15 Min.

- Zeit für die Spülung einer wässrigen Probe für die Entfernung von Aminosäuren, Antibiotika u.a. liegt unter praxisbezogenen Bedingungen im Durchschnitt bei 15-30 min (abhängig von Substanzart und Konzentration sowie Druck).
- Durchflussrate für Wasser: 2 ml/min bei 100 kPa (1 bar)

2.4. Bedienungsanweisung für die Trennung von LAL-Test störenden Substanzen

1. Entpyrogenisieren Sie das Drucksystem (Druckbehälter ohne Manometer) in angeschlossener Form mit Trockenhitze 180 °C 4 Stunden oder 2 Std. bei 200 °C; Ventile offen lassen Abb. 3.
2. Füllen Sie den abgekühlten Druckbehälter unter aseptischen Bedingungen mit pyrogenfreier Lösung.
3. Entnehmen Sie die für Ihre Untersuchung benötigte Anzahl von sterilen, pyrogenfrei verpackten Disposables dem Karton.
4. Von einer Ecke am unteren Ende ziehen Sie die Schutzfolie vom Blisterunterteil ab.
5. Entnehmen Sie ein Disposable aus der Verpackung und verschließen den Auslauf mit einem Gummi stopfen. Abb. 4.
6. Spülen Sie jedes Disposable 2mal mit je 10 ml pyrogenfreier Lösung (0,9%ige NaCl, H₂O, Infusionslösung oder Puffer), indem Sie die Disposables mit eingefüllter pyrogenfreier Lösung kurz auf einem Laborrüttler (Vibrofix, Whirlmix etc.) rütteln und die Lösung anschließend verwerfen.
7. Füllen Sie die zu untersuchenden Proben (2-6 ml) mit pyrogenfreien Pipetten in die Disposables.
8. Schrauben Sie die Disposables an die Druckleiste und stellen Sie Glasbehälter zum Auffangen des Filtrats darunter, Abb. 5 - Anschlussreihenfolge:
Druckquelle | Druckschlauch 16664 | Druckleiste
Ultrasart D20.
- 8.1. Entfernen Sie die Gummistopfen.
- 8.2. Öffnen Sie das Ventil an der Druckquelle und die Hähne der Druckleiste; filtrieren Sie die Proben bei 1-2 bar, aber nicht bis zur Trocknung. Sobald eine Probe fast fertig filtriert ist, schließen Sie den entsprechenden Hahn am Druckverteiler.
- 8.3. Nach beendeter Filtration schließen Sie das Ventil der Druckquelle.
- 8.4 Entspannen Sie das System auf 0 bar durch kurzes Aufschrauben und sofortiges Wiederfestschrauben des Ventils an der Druckleiste. Abb. 6.

9. Zur vollständigen Abtrennung der noch verbliebenen LAL-Test störenden Substanzen ist die Spüllösung anzuschließen. (Anschlussreihenfolge: Druckquelle | Druckschlauch 16664 | Druckbehälter | Verbindungsschlauch 16698 | Druckleiste | Ultrasart D20) Abb.7. Füllen Sie das benötigte Volumen der Spüllösung (im Vorversuch festzulegen) in den Druckbehälter. Öffnen Sie das Ventil an der Druckquelle und (mit geschlossenen Hähnen der Druckleiste) entlüften Sie Druckschlauch und Druckleiste, indem Sie das Ventil an der Druckleiste ein wenig öffnen bis Flüssigkeit austritt. Öffnen Sie die Hähne an der Druckleiste. Sollte zu wenig Spüllösung in die Ultrasart D20 Disposables fließen, lockern Sie die Disposables einzeln (durch leichtes Drehen im Uhrzeigersinn) bis mindestens so viel Spüllösung vorhanden ist wie vorher Probelösung.
10. Nach Beendigung des Spülvorganges stellen Sie das Ausgangsvolumen der Probe ein (z.B. indem Sie das Retentat in den Disposables mit pyrogenfreier Lösung auf das ursprüngliche Probenvolumen auffüllen).
11. Ultrasart D20 mit Kappe sowie Gummistopfen verschließen und den Inhalt kurz auf dem Laborrüttler homogenisieren. Danach führen Sie den Pyrogentest nach entsprechender Gebrauchsanweisung des jeweiligen Lysatherstellers durch.
12. Nach Beendigung der Spülung wird die Edelstahlseinheit mit Wasser gereinigt und getrocknet bzw. sterilisiert oder entpyrogenisiert.

Zur Herstellung von sterilem Druckgas oder steriler Luft empfehlen wir ein Filtrationsgerät 16254 mit PTFE-Filter. Abb. 8.

Um das 16254 an das Drucksystem anschließen zu können, sind zusätzlich folgende Anschlüsse erforderlich:

17089 Anschlussstück M 12 × 1 Außengewinde | R3/8"

16664 Druckschlauch R3/8" Überwurfmutter mit Dichtkegel | Schnellverschlusskupplung

17069 Anschlussstück M 12 × 1 Außengewinde | R3/8" Überwurfmutter

Wichtige Hinweise:

1. Es soll darauf geachtet werden, dass das Filter während und nach der Filtration | Spülung nicht austrocknet (nicht längere Zeit ohne Flüssigkeit unter Druck stehen lassen).
2. Nach Filtration und Spülung muss die Probe 30-60 Sekunden lang auf einem Laborrüttler (z.B. Vibrofix o.ä.) homogenisiert werden und umgehend für den LAL-Test eingesetzt werden. Sollte die Pipettierung der entsprechenden Volumina für den LAL-Test verzögert werden, muss die Rüttlung wiederholt werden.
3. Soll das Filtrat verwendet werden, so muss die Filterunterseite (Ausgang) durch Filtration von ca. 10 ml Spülflüssigkeit pyrogenfrei gespült werden.

3. Zubehör für das Drucksystem

16223 Edelstahl Druckfiltrationsgerät

16254 Edelstahlfiltrationsgerät 47 mm

17069 Anschlussstück M 12 × 1 Außengewinde | R3/8" Überwurfmutter

17089 Anschlussstück M 12 × 1 Außengewinde | R3/8" Außengewinde

17152 Doppelschnellverschlusskupplung

17153 Aufschraubstecknippel für Doppelschnellverschlusskupplung

17161 Anschlussstück R3/8" Außengewinde | Luer Lock

16240 Edelstahl Druckfiltrationsgerät (PTFE beschichtet)

4. Ersatzteile

4.1. für Druckschläuche

6985128 Schnellverschlusskupplung

4.2. für Druckleiste

6985133 Ventil mit Anschlussstück und Dichtung

6985127 Dichtungen

6985132 Anschlussstück (für Ventil)

6980274 O-Ring, Silikon, 8 × 2 mm

4.3. für Druckbehälter

6986029 Aufschraubstecknippel

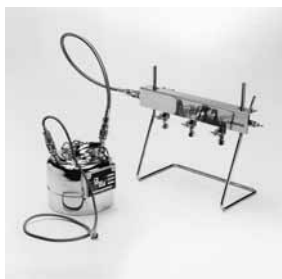
6985131 Kappe

6980145 Manometer 5 bar

6980389 Viton O-Ring, 85 × 5 mm

6980396 Viton O-Ring, 7,5 × 2,5 mm

6986129 Deckel mit Ventil



1



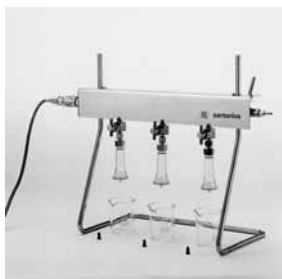
2



3



4



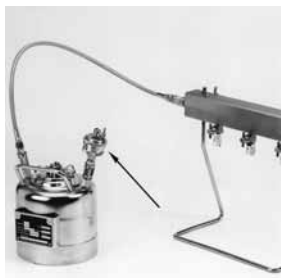
5



6



7



8

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen, Germany

Phone +49.551.308.0

Fax +49.551.308.3289

www.sartorius-stedim.com

Copyright by Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany. All rights reserved. No part of this publication may be reprinted or translated in any form or by any means without the prior written permission of Sartorius Stedim Biotech GmbH. The status of the information, specifications and illustrations in this manual is indicated by the date given below. Sartorius Stedim Biotech GmbH reserves the right to make changes to the technology, features, specifications and design of the equipment without notice.

Status:

October 2008,

Sartorius Stedim Biotech GmbH,
Goettingen, Germany

Printed in Germany on paper that has been bleached without any use of chlorine
W4A000
Publication No.: SU-6006-a08103
Order No. 82351-000-65