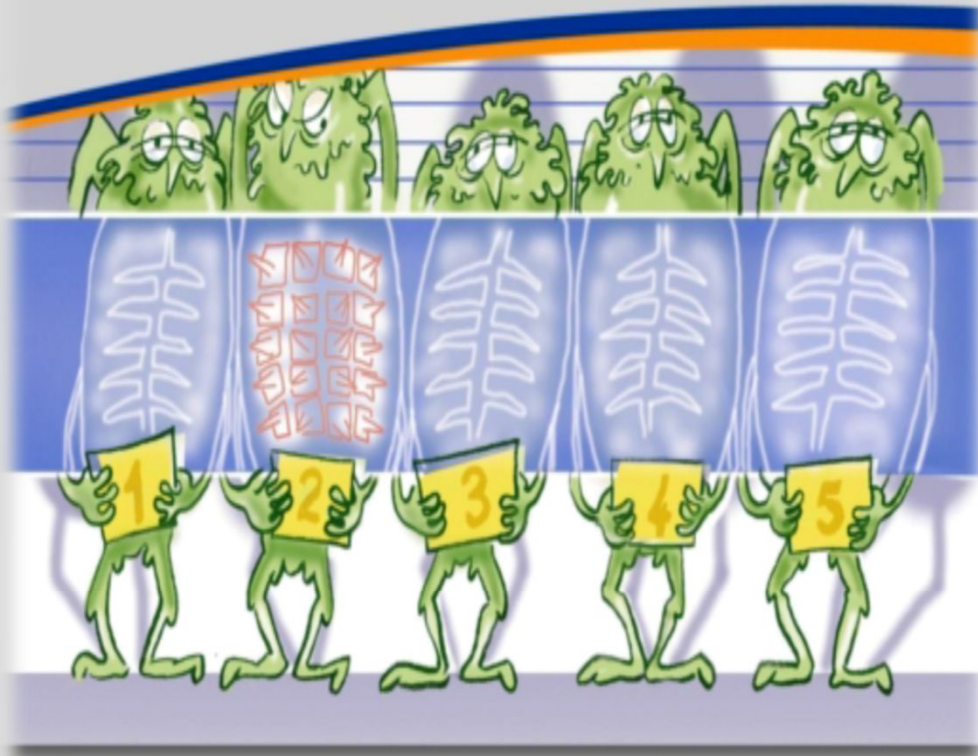




domatec

Endotoxine in Staub & Wasser

Dr. habil. Anna Salek



Endotoxine in Staub & Wasser

Dr. habil. Anna Salek

Domatec GmbH

Vorwort - Endotoxine



- **Endotoxine haben eine große Bedeutung sowohl in der Forschung als auch in der Pharma- und Umweltindustrie.**
- **Endotoxin-Kontamination können dramatische Auswirkungen bei der Kultivierung von Zellen haben und lösen sowohl im Tiermodell als auch im Menschen eine Immunantwort aus, die bis hin zum Tode führen kann.**
- **Daher ist eine stetige Kontrolle der eingesetzten Produkte auf ihnen Endotoxin-Gehalt unerlässlich.**

EndoLISA® :

Eine neue Methode zum Endotoxin-Nachweis



- **Oftmals genügen Methoden, die derzeit Verwendung finden bei dem Nachweis von Endotoxinen, nicht den Anforderungen der Anwender, da die Proben stark verdünnt werden müssen, um die Analyse der Proben durchführen zu können.**
- **Zudem verwenden die klassischen Endotoxin-Testmethoden das Blut der Pfeilschwanzkrebse und gefährden deren Existenz.**

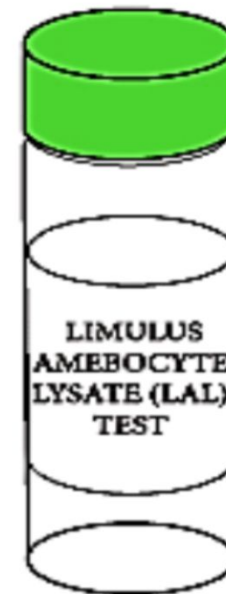
EndoLISA[®] :

Eine neue Methode zum Endotoxin-Nachweis



- **EndoLISA[®] ist eine innovative Methode, die auf den Einsatz tierischer Komponenten komplett verzichtet und starke Verdünnungen von den zu untersuchenden Proben unnötig macht. EndoLISA[®] ist für den quantitative Endotoxin-Nachweis in Umwelt-Proben (wie Staub und Kühlwasser) geeignet.**
- **EndoLISA[®] ist das Ergebnis langer Forschung und Entwicklung um die Limitierungen des LAL-Tests zu überwinden.**

EndoLISA® : Eine neue Methode zum Endotoxin-Nachweis



Limulus ameboocyte lysate (LAL) is an aqueous extract of blood cells (amoebocytes) from the blue-blooded horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. LAL is being used for endotoxin detection.

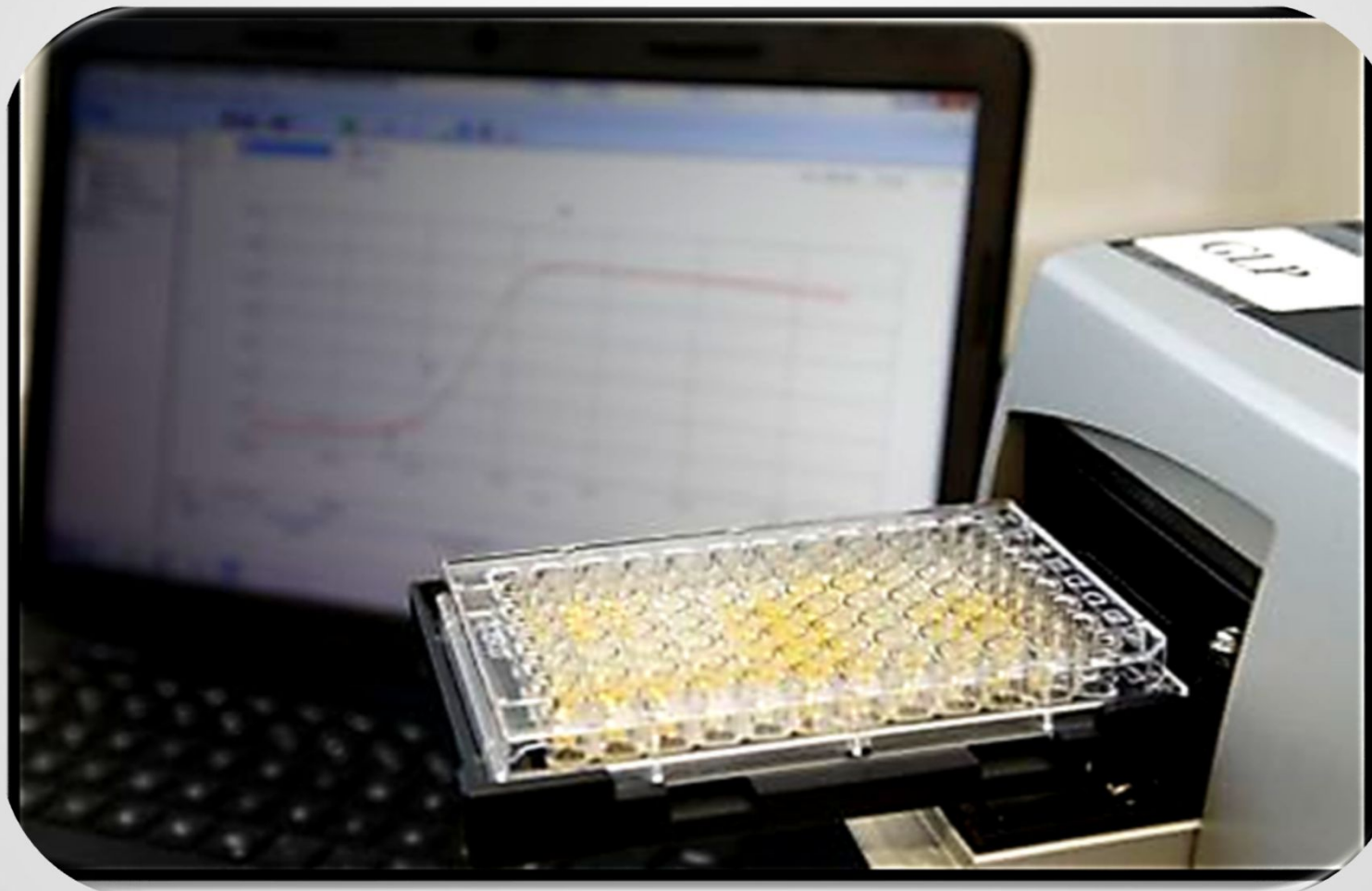
EndoLISA® :

Eine neue Methode zum Endotoxin-Nachweis



- **Die EndoLISA® Technologie verwendet ein Phagen-Protein, um Endotoxine spezifisch an eine Microwell-Festphase zu binden. Die Festphase und das Bindemolekül sind so gewählt, dass alle Endotoxin-Varianten mit gleicher Affinität erkannt werden.**
- **Nach Immobilisierung der Endotoxine an die Festphase erfolgt ein Waschschrift, bei dem potentiell störende Substanzen der Probenmatrix entfernt werden.**

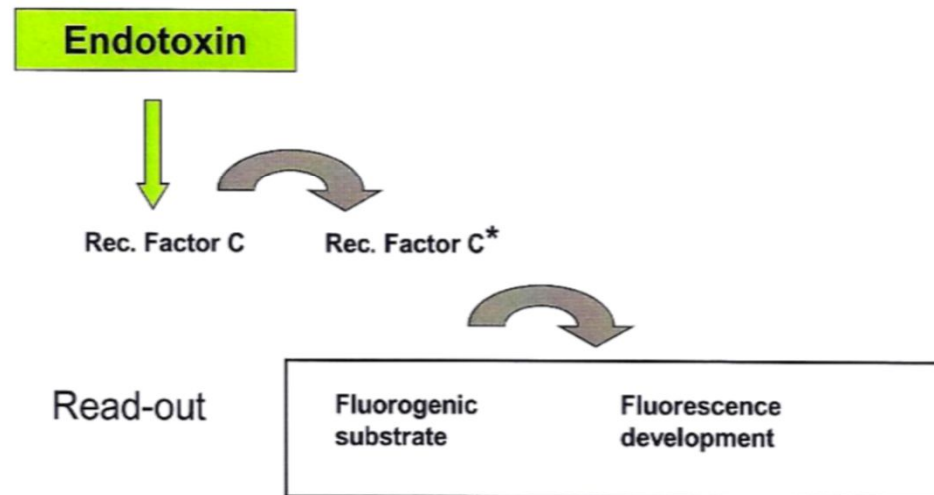
EndoLISA® : Eine neue Methode zum Endotoxin-Nachweis



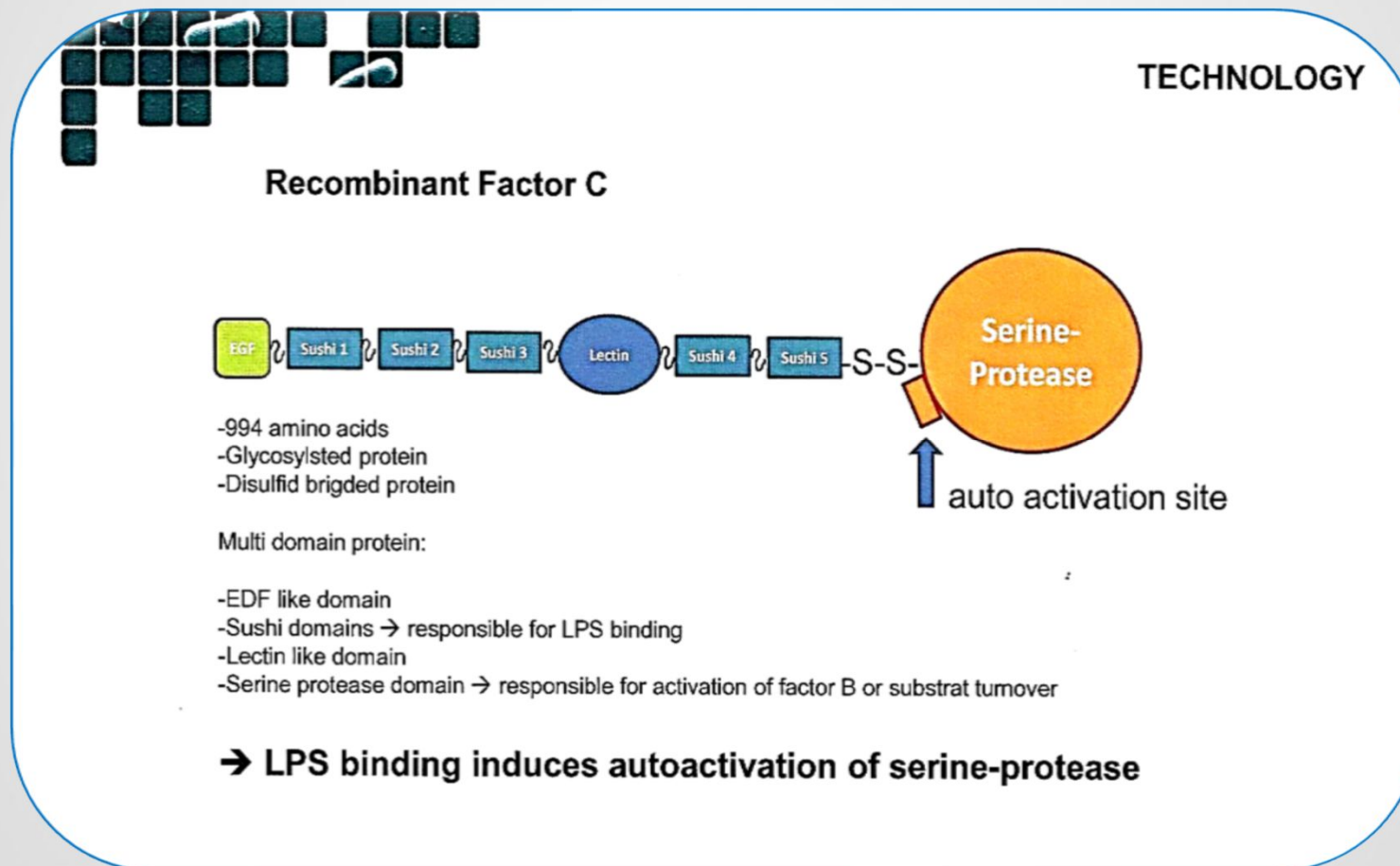
EndoLISA® : Prinzip der Methode zum Endotoxin- Nachweis

TECHNOLOGY

Test principle of the Recombinant Factor C Test:



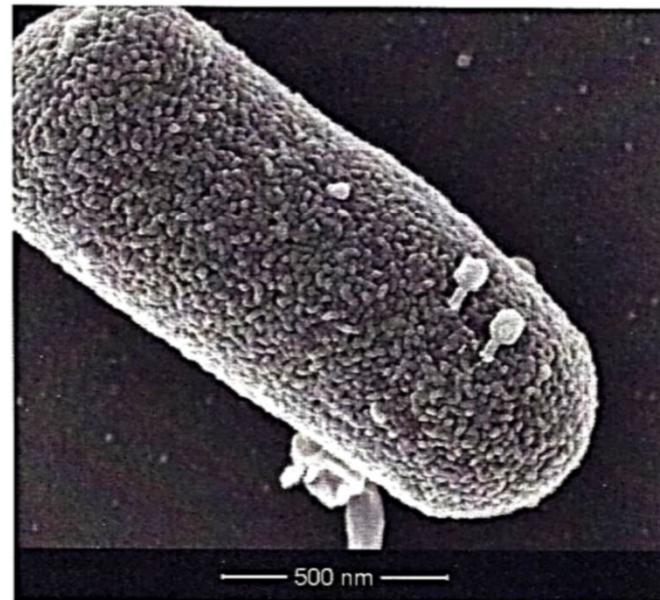
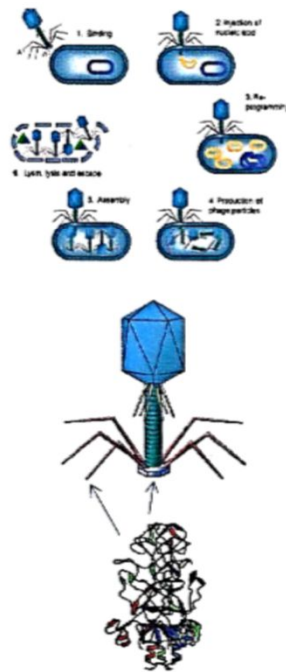
EndoLISA® : Prinzip der Methode zum Endotoxin- Nachweis



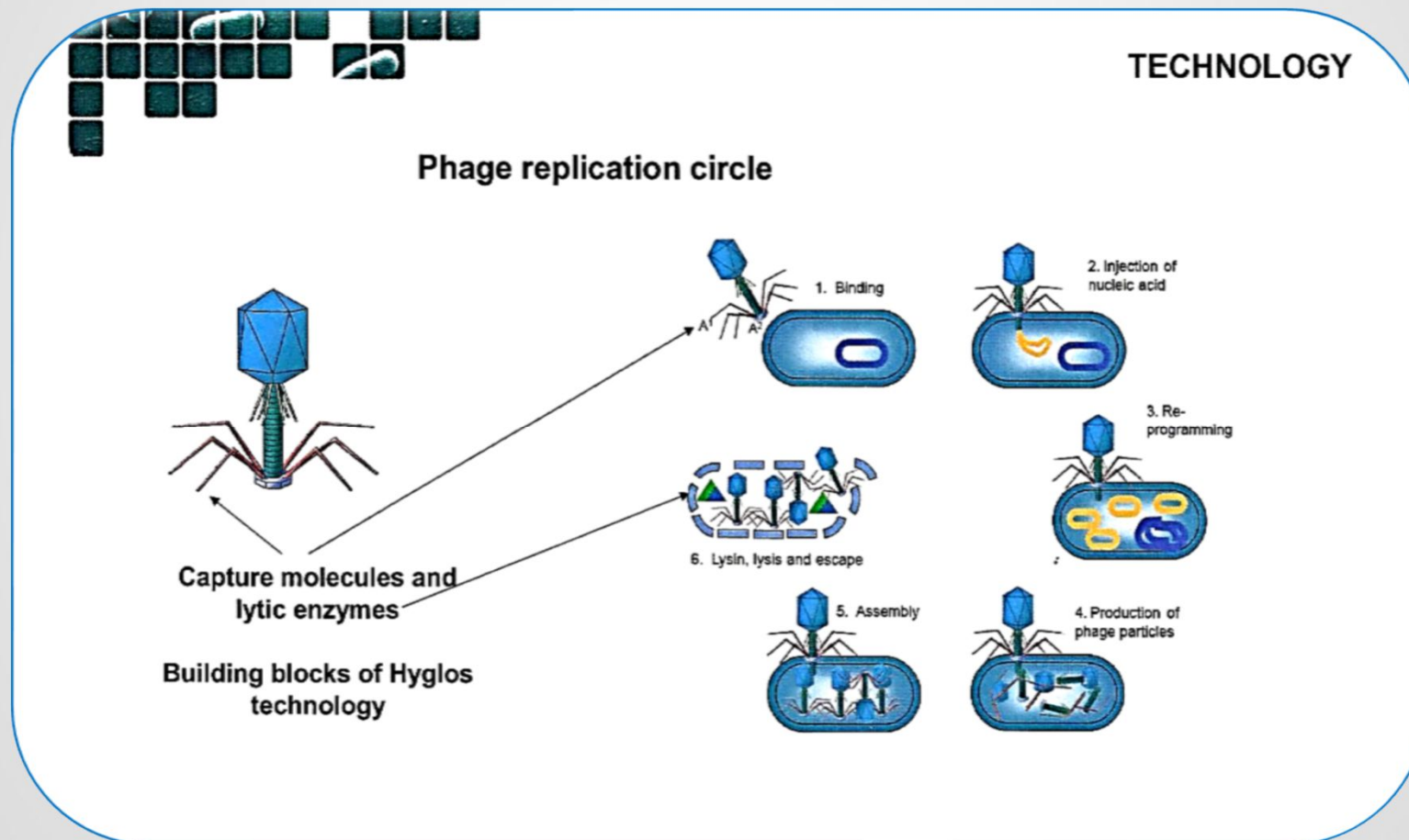
EndoLISA® : Prinzip der Methode zum Endotoxin- Nachweis

TECHNOLOGY

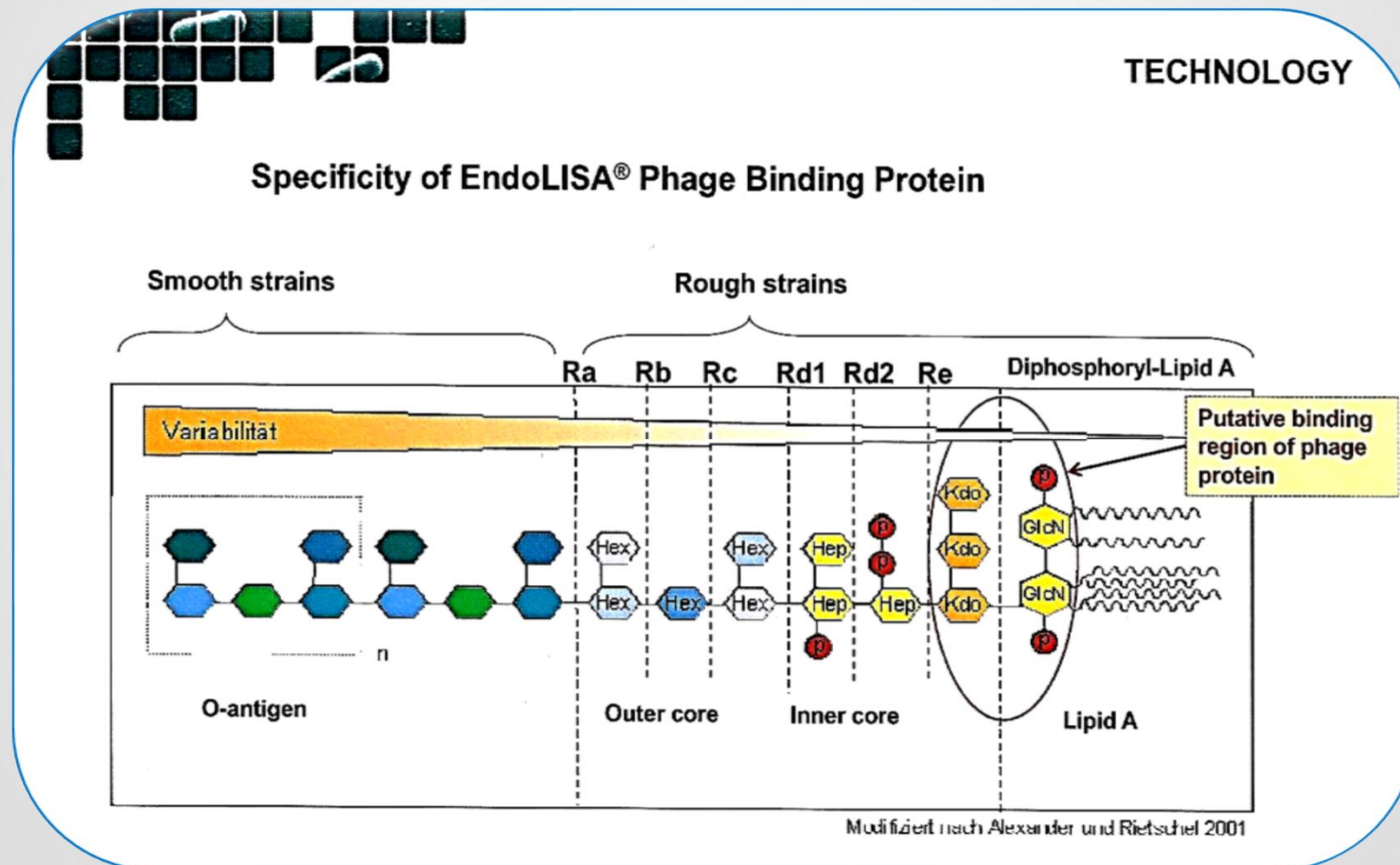
Phage derived proteins



EndoLISA® : Prinzip der Methode zum Endotoxin- Nachweis



EndoLISA® : Prinzip der Methode zum Endotoxin- Nachweis

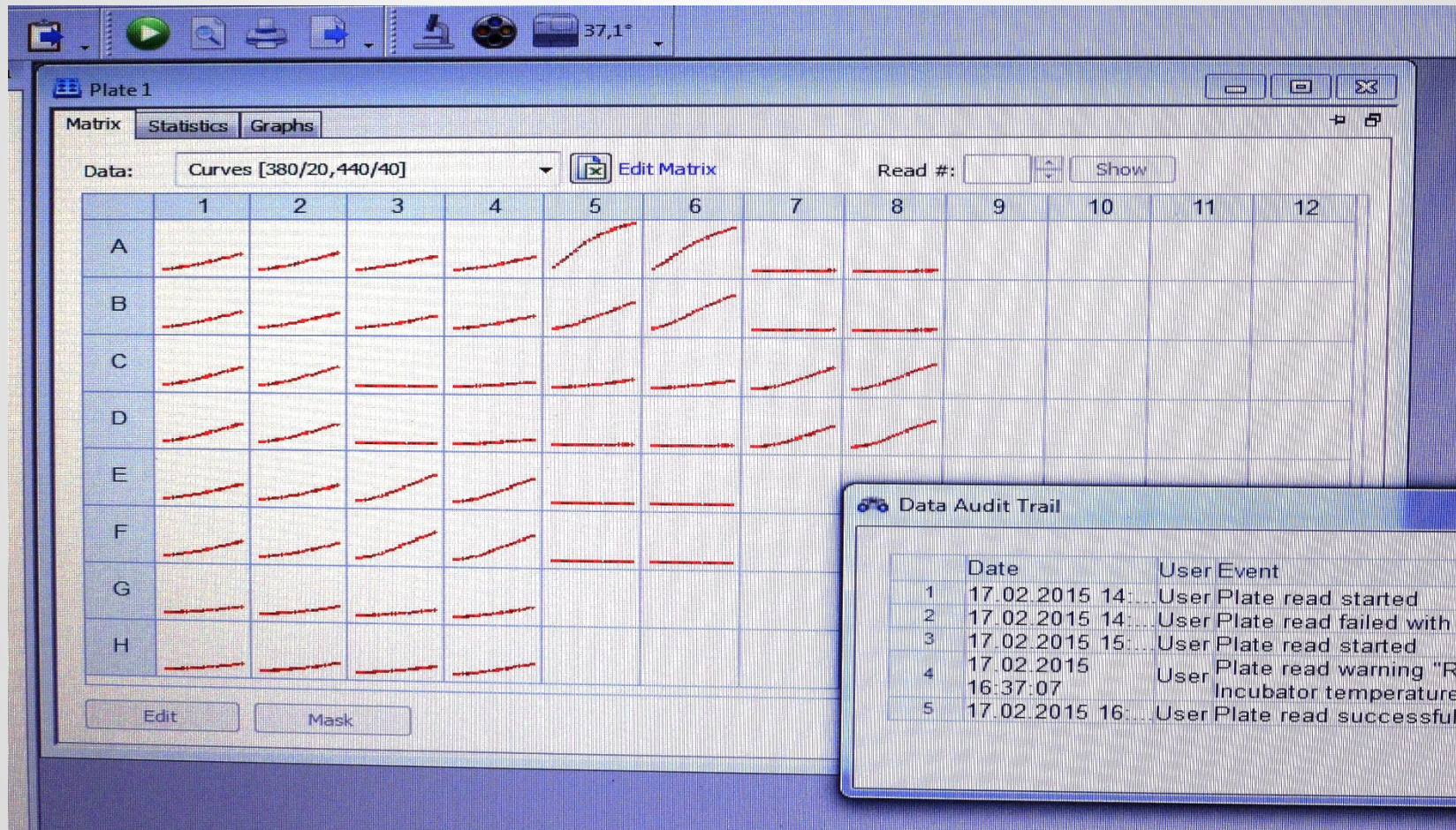


EndoLISA® : Methode zum Endotoxin-Nachweis

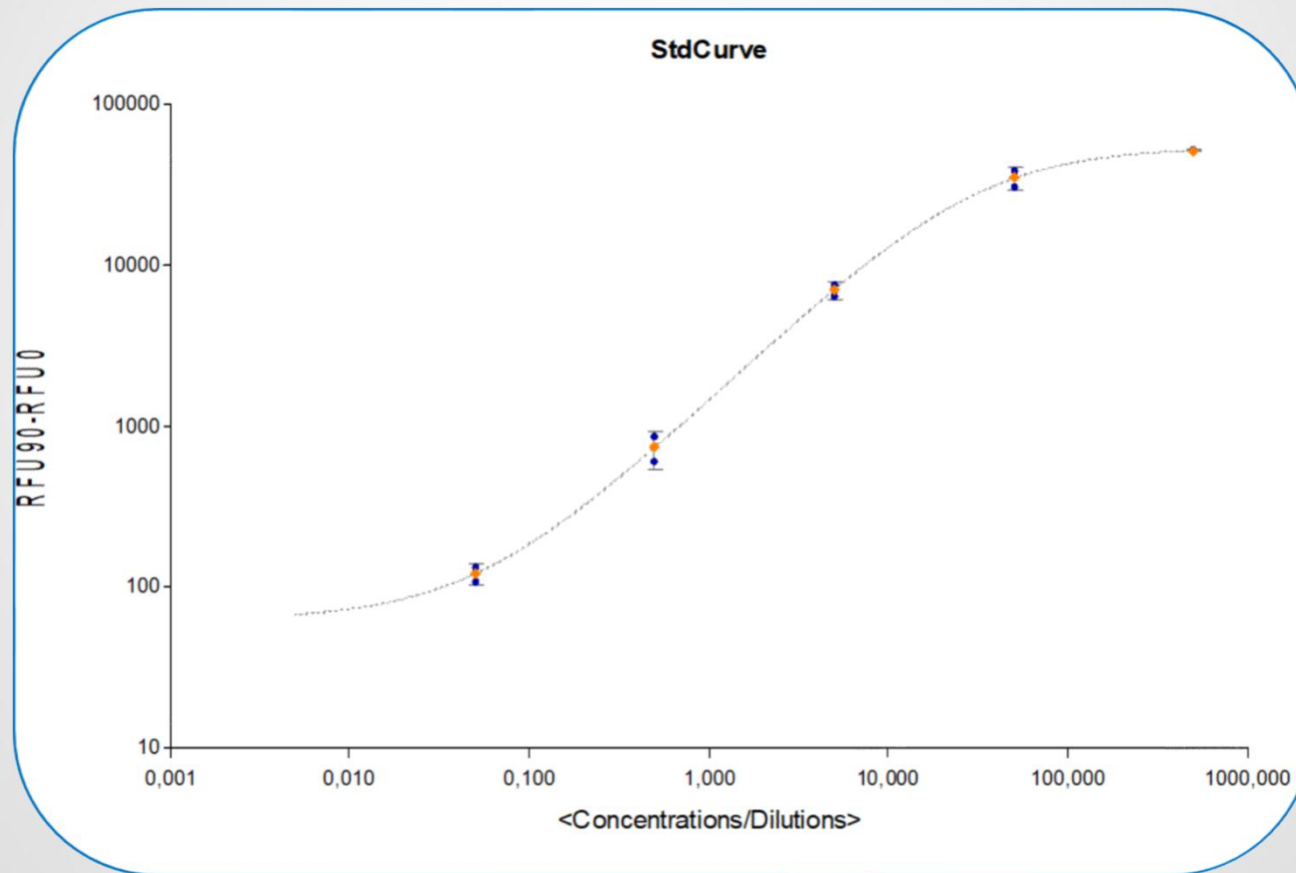


- **Im Anschluss kann der Endotoxin-Gehalt mittels des rekombinanten Faktor C und einem fluoreszierenden Substrat zuverlässig quantifiziert werden, ohne von inhibitorischen Probenbestandteilen gestört zu werden.**
- **Durch die Verwendung des rekombinanten Faktor C (rFC) ist gewährleistet, dass die Ergebnisse des EndoLISA® mit denen der existierenden Testformate übereinstimmen und zuverlässige Ergebnissen produziert werden können.**

EndoLISA® : Eine neue Methode zum Endotoxin-Nachweis



Ergebnisse: Standard Kurve



Plattenbelegung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					Std 500		VE	VE + Spike				
B					Std 50							
C					Std 5		VE 1:10	VE 1:10 + Spike				
D					Std 0,5							
E					Std 0,05		LW	LW + Spike				
F					blank							
G					blank		LW 1:10	LW 1:10 + Spike				
H					blank							
RFU 0min	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					75	80	80	84				
B					83	69	85	82				
C					82	97	84	86				
D					84	83	87	79				
E					85	84	85	162				
F					85	86	86	88				
G					82	83	86	84				
H					85	83	86	88				
RFU 100min	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					52111	52302	1539	10600				
B					39172	31318	1743	7296				
C					7805	6564	272	6450				
D					973	686	269	6521				
E					219	193	2483	8472				
F					142	142	2521	8844				
G					139	137	417	7930				
H					144	138	380	7860				
RFU 100-0min	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					52036	52222	1459	10516				
B					39089	31249	1658	7214				
C					7723	6467	188	6364				
D					889	603	182	6442				
E					134	109	2398	8310				
F					57	56	2435	8756				
G					57	54	331	7846				
H					59	55	294	7772				
EU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					447,131	477,794	0,99	7,712				
B					69,185	38,521	1,125	5,06				
C					5,45	4,499	0,102	4,422				
D					0,6	0,402	0,097	4,48				
E					0,06	0,04	1,627	5,907				
F					<0,000	<0,000	1,652	6,261				
G					<0,000	<0,000	0,208	5,545				
H					<0,000	<0,000	0,181	5,488				

Name	EU/ml	EU/ml * Verdünnun g	Spike Recovery
VE unverdünnt	1,0575	1,0575	107%
VE 1:10	0,0995	0,995	87%
LW unverdünnt	1,6395	1,6395	89%
LW 1:10	0,1945	1,945	106%

II Experiment mit 10 Staubproben (17.02.2015)

Probenbeschreibung	EU / ml (=0,02 g Staub)	EU / 1 g Staub	Entspricht ng LPS / g	Entspricht KBE Bakterien / g
1. (I Seria, Nr. 1)	12,1045	605,225	60,5225	6,1 x 10 ⁷
2. (I Seria, Nr. 2)	15,0665	753,325	75,325	7,5 x 10 ⁷
3. (I Seria, Nr. 3)	11,6970	584,850	58,485	5,9 x 10 ⁷
4. (I Seria, Nr. 4)	4,2830	214,150	21,415	2,1 x 10 ⁷
5. (I Seria, Nr. 5)	9,3145	465,725	46,573	4,7 x 10 ⁷
6. (II Seria, Nr. 1)	0,0535	2,675	0,2675	2,7 x 10 ⁵
7. (II Seria, Nr. 2)	35,1990	1759,950	175,995	1,8 x 10 ⁸
8. (II Seria, Nr. 3)	4,5180	225,900	22,590	2,3 x 10 ⁷
9. (II Seria, Nr. 4)	0,3645	18,225	0,1822	1,8 x 10 ⁴
10. (II Seria, Nr. 5)	20,4325	1021,625	102,1625	1,0 x 10 ⁸

Endotoxin Nachweis in Wasserproben



ENDOTOXIN DETECTION IN WATER SAMPLES

Results:

Probe	EndoLISA (EU/ml)	EndoZyme (EU/ml)	Pyrogen (EU/ml)	LAL Lonza (EU/ml)	LAL ACC (EU/ml)	Mean (EU/ml)
2	0,182	0,245	0,328	0,269	0,342	0,256
4	2,036	7,989	11,524	5,290	12,350	6,710
6	<0,05	0,022	0,042	0,045	0,024	0,036
8	0,489	0,562	1,613	0,842	0,638	0,876
10	3,212	0,492	0,595	6,837	39,898	3,212
12	0,755	0,830	1,143	1,222	2,101	0,988
14	4,157	2,443	2,678	13,119	36,188	8,638
16	1,452	1,882	4,446	2,004	1,691	2,446
18	<0,05	0,005	0,010	<0,005	0,009	0,007
20	0,077	0,097	0,126	0,109	0,034	0,102
22	3,154	5,227	7,067	8,313	12,647	7,335
24	0,537	0,651	0,951	0,996	1,354	0,784
26	<0,05	0,018	0,019	0,016	0,011	0,016
28	0,563	0,717	1,157	1,164	1,207	0,900
30	2,548	3,058	5,327	12,146	25,887	11,254
31	0,041	0,106	0,109	0,089	0,106	0,086
32	<0,05	<0,005	<0,010	<0,005	0,027*	<0,005
33	<0,05	0,026	0,025	0,035	0,709*	0,028
34	<0,05	0,016	<0,010	0,016	0,018	0,017
35	<0,05	0,025	<0,010	0,018	0,020	0,021
valid samples	20	17	15	18	17	

Endotoxin Nachweis in Staubproben



ENDOTOXIN DETECTION IN DUST SAMPLES

Results:

Comparison of EndoLISA to LAL Tests

Sample	EndoLISA (EU/mg)	LAL manufacturer 1 (EU/mg)	LAL manufacturer 2 (EU/mg)
Sample 1	3,6	7,0	3,3
Sample 2	24,3	85,0	26,8
Sample 3	3,6	4,9	5,5
Sample 4	9,7	10,6	7,8
Sample 5	12,3	25,7	14,0
Sample 6	3,7	9,7	12,8
Sample 7	31,6	104,7	43,2
Sample 8	55,0	74,4	33,5
Sample 9	254,6	669,6	225,0
Sample 10	120,2	246,5	76,3

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



Dr. habil. Anna Salek

domatec GmbH - Laborleiterin
Mühlbauerstraße 6 | 84453 Mühldorf
T +49 8631-1676-251 | F +49 8631-1676-259

E-Mail Adresse: anna.salek@domatec.info
<http://www.domatec.info>

