

100 millioner endotoxin tests om året



AF CEO TOM MIKKELSEN,
SCAN DIA LABS

I 1970'ernes begyndelse udførtes årligt ca. 10.000 tests for giftstoffet endotoxin fra Gram-negative bakterier. I dag udføres den såkaldte Limulus test årligt over 100 millioner gange globalt. Testen blev udviklet på basis af et koagulerbart ekstrakt udvundet fra celler i Dolkhalernes blå blod.

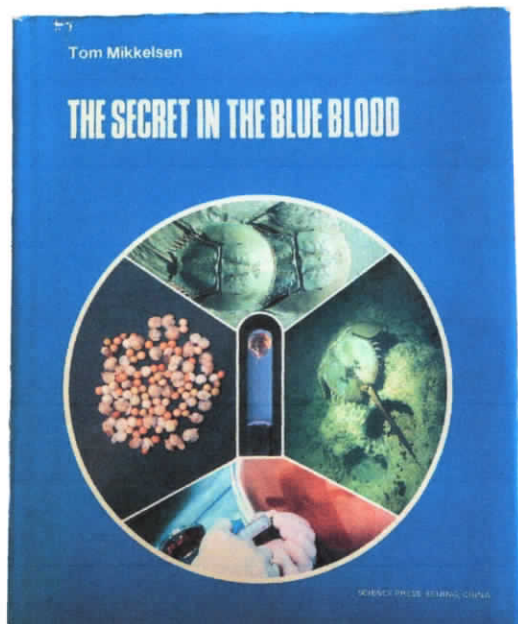
I omkring 500 millioner år har dolkhalerne levet langs oceanernes kyster, fortrinsvis i stille bugter og lavvandede, subtropiske laguner. Dermed er dolkhalerne placeret blandt de ældste, nulevende skabninger på Jorden. Deres livsform i dag er uændret den samme som for hundreder af millioner år siden, og heller ikke deres udseende har ændret sig bemærkelsesværdigt gennem de sidste 360 millioner år, omend antallet af arter er skrumpet ind til de nulevende fire: Een art (*Limulus polyphemus*) langs Nordamerikas Østkyst fra Nova Scotia hele vejen ned til Yucatan halvøen i den Mexicanske Golf, og tre sydøstasiatiske arter med bopæl fra Indiens Østkyst til farvandedene omkring Japan, Kina, Viet Nam, Indonesien, Filippinerne og New Guinea.

Dolkhalerne, som har aristokratisk blå blod i deres årer (ilttransporten foregår med hæmocyanin), har påkaldt sig menneskets opmærksomhed på forskellig vis. Eftersom dyrene var talrige langs Amerikas Østkyst, begyndte nybyggerne at bruge de indtørrede aristokrater som gødning på markerne, og som foder til grise og fjerkræ. Til at tjene disse to formål, indfangede man i løbet af året 1856 mere end 1,2 millioner dyr på blot et par kilometer af Cape May stranden i Delaware bugten. Dolkhalefangsten toppede i 1930 med slagtningen af ikke mindre end 5 millioner eksemplarer langs hele Amerikas østkyst, men efterhånden var bedre gødningsformer vundet frem, og da man samtidig havde konstateret, at dolkhalefoderet gav kød og æg en uheldig (?) bismag, fik dolkhalerne atter lov at være i fred.

I begyndelsen af 1950'erne arbejdede den dansk-amerikanske læge Frederik B. Bang ved Woods Hole's berømte marinbiologiske laboratorier i den øst amerikanske stat Massachusetts, og her påbegyndte han udpakningen af, hvad der



Resultatet af en formiddags arbejde i blodbanken, Florida Keys 1981.



With his highly entertaining and beautifully illustrated book THE SECRET IN THE BLUE BLOOD Tom Mikkelsen has made an extremely important contribution not only to the international scientific literature but also to the very friendly relations between Denmark and The People's Republic of China.

*Tang Shengxi
Professor
Guangxi Medical College
Nanning*

skulle vise sig at blive Dolkhalesnes (hidtil) største gave til menneskeheden: Limulus Testen til specifik påvisning af endotoxin.

Frederik Bang fandt ud af, at et vandigt og vandklart ekstrakt af Dolkhalesnes blodceller stivnede til en blåhvid gele hvis man tilsatte forsvindende små mængder af bakteriegiftstoffet endotoxin. Celleekstraktet kaldes *Limulus Amoebocyt Lysat*, eller, i daglig tale, blot LAL. Kun de såkaldt Gram-negative bakterier (eksempelvis *E. coli*, *Salmonella*, *Legionella*, etc.) udskiller endotoxin, og kun endotoxin udløser Dolkhalesnelles koagulationsmekanisme. I 1956 offentliggjorde dr. Bang sine observationer i en videnskabelig artikel med titlen "En bakteriel sygdom hos *Limulus polyphemus*". Artiklen vakte ikke videre opmærksomhed, men Frederik Bang fortsatte systematisk sit arbejde sammen med kollegaen, dr. Jack Levin, og med offentliggørelsen af tre overbevisende, videnskabelige publikationer i 1964 var det kun et spørgsmål om tid, før der udløstes en verdensomspændende, videnskabelig lavine. In vitro Limulus testen så dagens lys, og freden var atter ved at være forbi for de levende fossiler.

Endotoxin er i alt og på alt, og udgør under normale omstændigheder ikke den ringeste fare for mennesket. Eksempelvis trives vi jo generelt storslået med de ca. 2 milliarder endotoxinproducerende Gram-negative bakterier, vi til stadighed huser i vort fordøjelsessystem. Men blot 2 nanogram endotoxin pr. kg. legemsvægt indsprøjtet intravenøst på et voksent, sundt menneske kan udløse influenza-lignende symptomer: Temperaturstigning,

kulderystelser, hovedpine, træthed, muskelsmerter, kvalme og – af og til – opkastninger. Et nanogram er en milliarddel af et gram! Endotoxiner kan forårsage særdeles alvorlige beskadigelser i en række af vores biokemiske systemer, inklusive det temperaturregulerende center i hjernen, blodets forskellige cellepopulationer, hjerte-kar systemet, de hormonale systemer, stofskiftesystemet og det immunologiske overvågningsapparat, hvilket i grelle tilfælde kan føre til vidtspredte koagulationsforstyrrelser, blodtrykssænkning, kredsløbskollaps, chok og død.

Limulus testen bruges til endotoxinkontrol af eksempelvis blodprodukter, vacciner, infusionsvæsker, dialyseprodukter, hundredevis af farmaceutiske produkter, luft (indeklima), kirurgiske handsker, implantater, vækstmedier, IVF produkter, røntgenkontrastmidler samt den store og vigtige gruppe af sterile eengangsprodukter. Alle disse produkter, og en lang række andre, skal i dag opfylde bestemte endotoxinkriterier, alt efter deres brug. Andre produkter, eksempelvis drikkevand, mejeriprodukter, modermælkserstatning, kemikalier, forarbejdet kød og fisk, bør løbende underkastes endotoxin-kontrol for at sikre en pletfri produktions-hygiejne.

Efter en årrække, hvor vi bestræbte os på at forbedre Limulus-testens følsomhed, blev de første Limulus lysater gjort tilgængelige i USA i 1972.

I 1973 publicerede det amerikanske FDA de første officielle retningslinier for brugen af Limulus testen, og i 1977 udstedte de amerikanske myndigheder

de første to kommercielle licenser til at producere LAL reagenset. I 1978 tillod US FDA at erstatte den uspecifikke og besværlige kanin pyrogen test med LAL testen, og hermed kunne kaninerne så småt begynde at ånde lettere op. I dag er Limulus testen optaget og harmoniseret i alle verdens farmakopéer som "The Bacterial Endotoxins Test".

De tidlige teknikker, som alle var kvalitative, er sendt på museum efter mange års tro tjeneste. I dag anvender vi udelukkende avancerede, automatiserede systemer, som angiver indholdet af endotoxin i en prøve helt præcist. Ved anvendelsen af et computerstyret kinetisk-turbidimetrisk assay, måler vi i vores laboratorium rutinemæssigt så lidt som 0.001 EU/ml, hvor 1 EU (Endotoxin Unit) svarer til 0.1 nanogram eller 100 picogram, om man vil. I mange år bestræbte vi os på at nedbringe den nødvendige mængde LAL, således at vi i dag bruger blot 50 microliter reagens pr. prøve. Jo mindre LAL vi brugte, jo færre Dolkhales behøvede vi indkalde til "blodbanken". Men, som jeg kommer ind på senere, er den partielle tapning ikke længere så relevant. Blodbanken er overflødig og derfor lukket i 2024.

Horseshoe crabs kaldes de hvirvelløse dolkhales populært. De er imidlertid ikke krabber, men klassificeres som regel sammen med skorpioner og edderkopper, hvor de strengt taget heller ikke hører hjemme. Nærmest er de i slægtskab med de op til 3 meter lange havskorpioner, som er uddøde for længst. Dolkhalesne var talrige i europæiske farvande indtil for omkring 65 millioner år siden, hvor de til-



Svensk TV på besøg i det spæde Endotoxinlaboratorium på Blegdamshospitalet.

syneladende brød op, og emigrerede dels til Amerika, dels til det fjerne østen.

Dolkhalen er én af menneskehedens største livreddere – og måske den mindst kendte og påskønnede. Med dolkhales blodceller som eneste kilde til den fænomenale endotoxintest, måtte dolkhalesne behandles med den største hensynsfuldhed og respekt. Når dyrene (som kan nå en kropslængde på 1 meter fra halespidsen til skjoldets forkant, og en vægt på henved 10 kg) havde afgivet ca. en femtedel af deres samlede blodvolumen (som er på ca. 600 ml hos en voksen hun), skulle de genudsættes, hvor de var indsamlet, og naturligvis måtte man ikke indsamle dyrene i parringstiden, hvor de samledes i kæmpe flokke på udvalgte strande. Ikke alle overholdt disse etiske spilleregler, og af disse, og andre grunde, var der en gryende frygt for dolkhalesnes fremtid. Vi kunne ikke undvære endotoxintesten, men vi kunne ej heller ustraffet drive tankeløs rovdrift på dyrene. Jeg husker et uformelt møde i Singapore for adskillige årtier siden, hvor vi diskuterede mulighederne: Kunne man forestille sig et syntetisk Limulus lysat, uden brug af dolkhalesnes blodceller? Optimismen var stor, men vores viden og teknisk-videnskabelige kunnen var begrænset. Mange år senere blev svaret imidlertid fundet i den moderne genteknologi. Herom senere.

På Blegdamshospitalet i København etablerede jeg i begyndelsen af 1970'erne

Europas første endotoxinlaboratorium med uvurderlig støtte af Blegdamshospitalets navnkundige chef, professor, dr. med. Viggo Faber, samt en lang række fonde og enkeltpersoner. Endotoxinlaboratoriet var blot en lille brik i et verdensomspændende, kompliceret puslespil, som nu er fuldbragt. På Blegdamshospitalet lykkedes det at øge amøbocytlysaternes følsomhed med en faktor 1 million, og som initiativtager til mange og lange ekspeditioner til dolkhalesnes levesteder langs Amerikas og Fjernøstens kystnære farvande har vi bibragt vigtig viden om de fire nulenvende arters udbredelse og levevis.

Ikke "kun" endotoxintesten, men hele dolkhaleeventyret er skabt af en international skare af entusiastiske og dedikerede forskere fra hospitalernes laboratorier, fra universiteterne og – ikke mindst – fra medicinalindustrien. Genetikere, infektionsmedicinere, mikrobiologer, zoologer, geologer, palæontologer og hæmatologer har alle trukket ved samme globale hammel, og efter godt 50 års intenst, globalt samarbejde er det lykkedes at fuldende cirklen:

Den enzymatiske kaskade reaktion, som er hemmeligheden bag dolkhalesnes enestående evne, er nu en syntetisk realitet. Ved hjælp af rekombinant DNA-teknik har vi i dag en fulgyldig endotoxin test til rådighed uden brug af dolkhalesnes blodceller, og testen er anerkendt af alle verdens Farmakopéer – også amerikanske

USP og FDA, efter lange og grundige overvejelser.

50 års teknisk-videnskabeligt udviklingsarbejde er således kronet med succes. I de seneste års opløb har USA og Japan haft førertrøjen på, men en frodig underskov af forskere fra stort set hele verden har ydet deres væsentlige bidrag. Det har været mit privilegium af deltage i samtlige 50 år. For de, der gerne vil vide mere – og der er rigtig meget at vide – kan jeg invitere indenfor på www.scandialabs.com, hvor bl.a. bogen "The Secret in the Blue Blood" er at finde i sin fulde længde i pdf-format, om end kun i den engelske udgave, skønt bogen blev udgivet af Academia Sinica, Det Kinesiske Videnskaberne Akademi's forlag, Science Press, i 1988.