English

LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE

PYROTELL®

Multitest Vial
for the Detection and Quantitation of Gram Negative Bacterial Endotoxins (Lipopolysaccharides)

The *Limulus* amebocyte lysate (LAL) test, when used according to U.S. Food and Drug Administration (FDA) guidelines (1), may be substituted for the U.S. Pharmacopeia (USP) Pyrogen Test (rabbit fever test) for the end-product testing of "human injectable drugs (including biological products), animal injectable drugs, and medical devices." The LAL test is recommended for the quantitation of endotoxin in raw materials used in production, including water, and for in-process monitoring of endotoxin levels. The USP Bacterial Endotoxins Test (2) is the official test referenced in specific USP monographs.

Summary of Test

Limulus amebocyte lysate is an aqueous extract of blood cells (amebocytes) from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. The LAL test is performed by adding 0.1 mL reconstituted Pyrotell to 0.1 mL of the test specimen in a 10 x 75 mm depyrogenated, flint (soda lime) glass, reaction tube. The reaction solution is mixed thoroughly and placed immediately in a dry block incubator or noncirculating water bath at 37 ± 1°C for 60 ± 2 minutes. At the end of the incubation period, the tube is removed from the incubator and inverted. If a gel has formed and remains intact in the bottom of the reaction tube after inversion of 180°, the test is positive; the concentration of endotoxin in the tube is greater than or equal to the sensitivity of the Pyrotell. Any other state of the reaction mixture constitutes a negative test indicating an endotoxin concentration less than the Pyrotell sensitivity. Even if a gel has formed but breaks or collapses upon inversion, the test is negative. The LAL test is rapid, specific, easy to perform, and highly sensitive. Pyrotell can detect as little as 0.03 Endotoxin Units (EU) per mL using the gel-clot technique.

History and Biologic Principle

Howell described the clotting of *Limulus* blood in 1885 (3). In the 1950's, Bang at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, discovered that gram negative bacteria cause *Limulus* blood to clot (4). Levin and Bang later determined that the reaction is enzymatic and that the enzymes are located in granules in the amebocytes (5). They showed that clotting is initiated by a unique structural component of the bacterial cell wall called endotoxin or lipopolysaccharide (6). Current understanding is that the reaction leading to clot formation is a cascade of enzyme activation steps. While the complete reaction is not understood, the last step is well described. Clotting protein (coagulogen) is cleaved by activated clotting enzyme; the insoluble cleavage products coalesce by ionic interaction to form the gel matrix. More information about the LAL reaction and its applications is available in the literature (7, 8, 9).

Reagent

Pyrotell *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) is packaged in lyophilized form in 2, and 5 mL/vial fill sizes. Pyrotell contains only an aqueous extract of amebocytes of *L. polyphemus*, 1.5% v/v of 25% human serum albumin (stabilizer), 3% NaCl, and other appropriate ions. No preservatives, buffers, or other ingredients have been added.

Associates of Cape Cod, Inc. offers individual lots of Pyrotell in sensitivities ranging from 0.03 to 0.5 EU/mL based on the USP Endotoxin Reference Standard (also referred to as the reference standard endotoxin or RSE). Sensitivity, λ, is the minimum concentration of RSE that produces a firm gel-clot under standard conditions. The lot sensitivity, EU/mL, is printed on the vial and package labels. Specify the sensitivity desired when placing an order.

Use Pyrotell for in vitro diagnostic purposes only. Do not use it for the detection of endotoxemia. The toxicity of this reagent has not been determined; thus, caution should be exercised when handling Pyrotell.

Reconstitute Pyrotell as follows:

1. Gently tap the vial of Pyrotell to cause loose LAL to fall to the bottom of the vial. Remove the crimp seal and break the vacuum by lifting the gray stopper. Do not contaminate the mouth of the vial. Do not inject through or reuse the stopper. A small amount of LAL left on the stopper will not affect the test. Cover the vial with Parafilm "M"® (American National Can™) when not in use.
2. Reconstitute Pyrotell with LAL Reagent Water (LRW, see "Test Reagents") or compatible buffer (Associates of Cape Cod, Inc.). Add 2.0 or 5.0 mL as indicated on the vial label. The lyophilized LAL pellet will go into solution within a few minutes. Before use, gently mix the contents of the vial to ensure homogeneity. Mixing too vigorously may cause excessive foaming which can cause a loss of sensitivity.

Storage Conditions

Freeze-dried Pyrotell is relatively heat stable and, if kept refrigerated, will retain full activity through the expiration date on the vial label. Upon receipt, store the product at -20 to +8°C. Temperatures below -20°C shrink the stopper, leading to a loss of vacuum and possible contamination of Pyrotell. Temperatures in excess of 37°C can cause rapid deterioration of lyophilized Pyrotell as evidenced by loss of sensitivity and a distinct yellowing of the product. Pyrotell is shipped with cold packs in insulated containers to protect against high temperatures.

Reconstituted Pyrotell is usually clear and slightly opalescent. An occasional lot will exhibit a slight, uniform turbidity. The presence of small fibers or strands does not indicate contamination nor affect activity; however, flocculent precipitation or a distinct yellow color does indicate deterioration.

Reconstituted Pyrotell is less stable than the freeze-dried product; vials can be held for up to 24 hours at 2 to 8°C. Reconstituted Pyrotell can be frozen once. The product will retain activity for three months if frozen immediately after reconstitution and held at or below -20°C. After thawing, the same visual criteria for quality are applied as for initial reconstitution.

Specimen Collection and Preparation

Specimens should be collected aseptically in non-pyrogenic containers. Reused, depyrogenated glassware or sterile, disposable, polystyrene plastics are recommended to minimize adsorption of endotoxin to container surfaces. Not all plastic containers are free of detectable endotoxin and an extractable substance from some types may interfere with the LAL test. Containers (selected randomly from a batch) may be rinsed with a small volume of LRW (room temperature for one hour) and the rinse tested as a specimen to determine whether or not the batch is acceptable.

The pH of the reaction mixture (sample added to Pyrotell) should be 6 to 8. Adjust the pH of the specimen with HCl or NaOH (free of detectable endotoxin) or compatible buffer (See #3 below). Dilute concentrated HCl or NaOH with LRW to normalities that will not lead to significant dilution of the test specimen when adjusted. Do not adjust the pH of unbuffered saline or water.

Substances that denature proteins, chelate cations, bind endotoxin or alter endotoxin's hydrophobic state may interfere with the test. Interference may be detected as recovery of significantly more or less endotoxin than that expected when a known amount of standard endotoxin is added to the specimen (see "Limitations of Procedure"). In most cases, dilution of the specimen will reduce the concentration and activity of interfering substances and still yield valid test results. Appropriate controls and dilution schemes are discussed under "Test Procedure."

Specimens should be tested as soon as possible after collection. It may be advisable to freeze a nonsterile specimen that will be stored or shipped before testing. Specimens expected to contain low concentrations of endotoxin (less than 1 EU/mL) should be tested for loss of endotoxin during storage.

Test Procedure

Test Reagents

1. *Pyrotell multitest* vial (see description and method of reconstitution in section above).
2. *LRW*, not provided with Pyrotell; order separately. Lyophilized Pyrotell must be reconstituted with water that shows no detectable endotoxin in the LAL test. Recommended sources include Associates of Cape Cod, Inc., or USP Sterile Water for Injection or Irrigation (WFI, without bacteriostat). The endotoxin limit for USP WFI is 0.25 EU/mL; therefore, WFI may have detectable endotoxin when tested with a more sensitive Pyrotell. To certify a new lot of water as an LRW, reconstitute Pyrotell and make dilutions of standard endotoxin with the new lot of water to confirm the sensitivity of the Pyrotell. If the test sensitivity of the lot is confirmed and the negative control shows no increase in viscosity and no flocculent precipitation, the water is suitable for use. Use LRW to reconstitute Pyrotell and endotoxin standards and to dilute endotoxin standards and test specimens.
3. *Buffer*, not provided with Pyrotell; order separately if required. Pyrosol buffer (Cat# BR051 or BC554) or Glucashield™ buffer (Cat# GB051) can be used instead of LRW to reconstitute Pyrotell to help overcome a sample pH problem or interference from glucans.
4. *Standard Endotoxin*, not provided with Pyrotell; order separately. Control Standard Endotoxin (CSE), obtained from Associates of Cape Cod, Inc., is used to confirm the sensitivity of Pyrotell, validate product, and prepare inhibition controls. Each vial contains a measured weight of endotoxin. USP Endotoxin Reference Standard may be obtained from the U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Follow manufacturers' directions for reconstitution and storage of standard endotoxins. CSE lots may show different potencies (EU/ng) when tested with various lots of Pyrotell. Request a Certificate of Analysis for the potency of a CSE with a specified lot of Pyrotell.

Materials and Equipment (not provided)

1. *Reaction tubes*, 10 x 75 mm, depyrogenated, flint (soda lime) glass (Cat# TS050). Some brands exhibit inhibitory properties with certain lots of Pyrotell. Depyrogenated tubes are available from Associates of Cape Cod, Inc.
2. *Noncirculating water bath* or dry block incubator (Cat# TH120) capable of maintaining 37±1°C.
3. *Test tube racks* to hold and/or incubate reaction tubes.
4. *Pipets*, automatic pipetters with pipet tips, or repeating pipetters with plastic syringe barrels. Sterile, disposables are recommended.
5. *Vortex-type mixer.*
6. *Parafilm "M".®* The side in contact with the paper backing is normally nonpyrogenic.
7. *Nonpyrogenic test tubes* with adequate capacity for making dilutions of endotoxin standard or test specimen. See "Specimen Collection and Preparation" for other containers suitable for dilutions.
8. *Hot air oven* with 250°C capacity for depyrogenation of glassware. Commonly used minimum time and temperature settings are 30 minutes at 250°C (2, 11).

Controls

Controls are necessary to ensure a valid test. Recommended procedures are detailed by the FDA (1) and USP (2).

1. Endotoxin controls

a. **Endotoxin standard series.** Prepare a fresh set of dilutions from the stock endotoxin solution each day. Make dilutions such that a final series of twofold dilutions will bracket the sensitivity (λ) of the Pyrotell. Concentrations of 2λ, λ, 0.5λ, and 0.25λ are recommended to confirm Pyrotell sensitivity. Use as few dilutions as possible with appropriate pipet volumes to maximize accuracy.

b. **Positive controls** may be used in the absence of a series of standard concentrations in certain circumstances. Refer to the FDA guideline (1) under "Routine Testing of Drugs by the LAL Test" for details. The positive control concentration should be 2λ.

c. **Positive product controls** are inhibition controls and consist of the specimen or dilution of specimen to which standard endotoxin is added. The final concentration of the added endotoxin in the test specimen should be 2λ.

2. Negative controls

LRW negative control(s) should be included with each batch of specimens tested. During product validation or inhibition/enhancement testing (1, 2), the specimen used to dilute standard endotoxin is also treated as a negative control.

Specimen Preparation for Limits Test or Assay

Either dilute the specimen to the required concentration to perform a limits (pass/fail) test or perform an assay by testing a series of concentrations (examples of the two types of tests are given in "Results and Interpretation"). Dilutions may be made in test tubes and the test volume transferred to the reaction tubes, or dilutions may be made directly in the reaction tubes to leave the test volume, 0.1 mL, in each tube. The dilution tested for a limits test is determined from the sensitivity of the Pyrotell and the endotoxin limit for the specimen. Refer to "Limitations of Procedure" or to the FDA guideline (1) for explanation and calculation of Minimum Valid Concentration (MVC) and Maximum Valid Dilution (MVD).

Performing the Test

Consistent technique is necessary to obtain satisfactory results.

1. Add 0.1 mL of reconstituted Pyrotell to each reaction tube containing 0.1 mL test specimen or control. Use a graduated (0.1 mL increments) pipet, or an automatic or repeating pipetter. Add Pyrotell to the negative control(s) first and from the lowest to highest concentration in each test series where carryover may be a problem. A fresh pipet or pipet tip is recommended for each entry into the Pyrotell vial. Shake the rack of tubes vigorously for 20 to 30 seconds to ensure thorough mixing. If there are only a few tubes, each may be vortex mixed for 1 to 2 seconds. Failure to mix adequately is a common cause of unsatisfactory tests.
2. Place the reaction tubes in a 37 ± 1°C water or dry bath for 60 ± 2 minutes. The reaction begins when LAL is added to the test specimen but does not proceed at an optimum rate until the mixture reaches 37°C. If large numbers of specimens are tested in parallel, the tests should be batched and started at intervals that permit the reading of each within the time limit.

   Do not disturb the reaction tubes during the incubation period. The gel-forming reaction is delicate and may be irreversibly terminated if the tubes are handled, agitated or vibrated. Do not use a water bath with a stirrer or other source of vibration. Submerge tubes above the level of the reaction mixture but not so deeply that they float or move about in the racks.
3. Remove and read reaction tubes one at a time. Do not wipe the tubes dry or bump them against the side of the rack during removal. Invert the tube in one smooth motion; do not pause half way in the inversion unless it is obvious that the gel has not formed. A positive test is indicated by the formation of a gel which does not collapse when the tube is inverted.

Results and Interpretation

Example of Standard Endotoxin Series

Confirm the sensitivity of the Pyrotell and qualify the laboratory or technician by performing the LAL test on a series of known standard endotoxin concentrations (1, 2) that bracket the labeled sensitivity (i.e., 2λ, λ, 0.5λ, and 0.25λ). For this example, the Pyrotell sensitivity (λ) is 0.25 EU/mL:

Endotoxin Concentration	*Test Result*
0.5 EU/mL (2λ)	+
0.25 EU/mL (λ)	+
0.125 EU/mL (0.5λ)	–
0.06 EU/mL (0.25λ)	–
LRW (negative control)	–

The endpoint of this assay is defined as the least concentration of endotoxin to give a positive test. The labeled sensitivity of the Pyrotell is confirmed if the endpoint is λ plus or minus a twofold dilution. In this example, the concentration of endotoxin in the last positive tube in the series is 0.25 EU/mL or λ; therefore, the sensitivity is confirmed. The test would be valid (sensitivity confirmed) if the endpoint were 0.125 to 0.5 EU/mL (the error of the method). To show an endpoint of 0.125 EU/mL, the 0.06 EU/mL level must be present in the series and be negative.

When the endotoxin assay is replicated, sensitivity is expressed as the geometric mean (GM) of the individual sensitivities:

$$GM = \text{antilog}\ ((\Sigma e)/f)$$

where Σe = sum of log endpoints, and f = number of replicate endpoints.

The LRW **negative control** should give a negative test. If the negative control clots, the LRW, glassware, or Pyrotell is contaminated. The mixture should be clear with no increase in viscosity. "Snowflake" or flocculent precipitation indicates an endotoxin concentration less than the Pyrotell sensitivity.

In the absence of the endotoxin series (1), a **positive control** may be included with the tests. The positive control at 2λ is the 0.5 EU/mL level in the example above. If the positive control is negative, the Pyrotell sensitivity is less than twofold of the labeled sensitivity and the specimen test is invalid. Loss of sensitivity may mean the Pyrotell has deteriorated, the endotoxin lost potency (often because of adsorption to container surface), or the test has not been conducted properly.

Example of a Limits (Pass/Fail) Test

It is possible to test one specimen concentration with a given sensitivity of Pyrotell and have the result indicate whether or not the test specimen has more or less endotoxin than its limit. In this example, the specimen concentration is 1 mg/mL and the desired or predetermined endotoxin limit for the specimen is 3 EU/mg (see "Limitations of Procedure"). The limit expressed in EU/mL,

$$(3\ \text{EU/mg})\ (1\ \text{mg/mL}) = 3\ \text{EU/mL},$$

is greater than the sensitivity of the Pyrotell, 0.25 EU/mL, so the specimen must be diluted to perform a pass/fail test. Determine the specimen dilution that will indicate a pass, < 3 EU/mL, or a fail, ≥ 3 EU/mL, by dividing the endotoxin limit in EU/mL by the sensitivity of the LAL:

$$3\ \text{EU/mL} / 0.25\ \text{EU/mL} = 12.$$

Combine one part specimen with 11 parts LRW to achieve the 1:12 dilution and test. The result will indicate whether the specimen passes the test at the 3 EU/mL limit. Positive product controls are included at the specimen dilution to rule out false negative results.

Example of a Specimen Assay

Endotoxin is quantified in an assay by finding the endpoint in a series of specimen dilutions. In the example below, the specimen is diluted with LRW and the dilutions in the table are tested; λ is 0.25 EU/mL. The results are scored as positive or negative.

Specimen Dilution	*Test Result*
undiluted	+
1:2	+
1:4	+
1:8	–
1:16	–
1:32	–
negative control	–

To calculate the concentration of endotoxin in the specimen, multiply the Pyrotell sensitivity (λ) by the reciprocal of the dilution at the endpoint:

$$\text{Conc.} = (\lambda)(4/1) = (0.25\ \text{EU/mL})(4) = 1\ \text{EU/mL}.$$

The concentration for replicate assays is expressed as the geometric mean.

A **positive product control** (specimen spiked with 2λ standard endotoxin) must be present and test positive to rule out false negative results. If the positive product control is negative and the positive control is positive, the specimen is interfering with (inhibiting) the LAL test. The specimen should be retested at a greater dilution (not to exceed the MVD; see "Limitations of Procedure").

Limitations of Procedure

The procedure is limited by the capacity of the specimen to inhibit or enhance the LAL test. If the procedure cannot be validated (1, 2) at a specimen concentration that is greater than the minimum valid concentration (MVC), then the LAL test cannot be substituted for the USP Pyrogen Test. The MVC is calculated as follows:

$$MVC = \frac{(\lambda)\ (\text{specimen dose})}{(\text{endotoxin tolerance limit})}$$

where λ is in EU/mL, specimen dose is in units per kg body weight, and the endotoxin tolerance limit is in EU/kg.

The maximum valid dilution (MVD) is the specimen dilution containing the MVC (1). It is the initial specimen concentration divided by the MVC.

The endotoxin tolerance limit (1) is 0.2 EU/kg for drugs with an intrathecal route of administration and 5 EU/kg for all other parenterals. The limit for medical devices is expressed per mL of an extraction or rinse volume obtained as described in the FDA guideline (1). For devices that contact cerebrospinal fluid, the limit is 0.06 EU/mL; for those that do not, it is 0.5 EU/mL. The limit for liquid devices is the same as that for drugs.

Trypsin will cause a false positive result unless denatured by heat treatment before testing. Materials such as blood, serum, and plasma should be treated to inactivate inhibitors prior to testing (12).

Expected Values

Endotoxin can be quantified if the concentration is greater than or equal to the Pyrotell sensitivity. Materials derived from biological sources, even after biochemical purification, may contain measurable levels of endotoxin. Water obtained by distillation, reverse osmosis, or ultrafiltration may contain less endotoxin than detectable as long as the purification process is operating correctly and the water is not contaminated after production.

Specific Performance Characteristics

The error of the gel-clot method is plus or minus a twofold dilution at the endpoint of the assay.

Bibliography

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, Current USP.
3. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of Limulus polyphemus, Callinectes hastatus, and Cucumaria sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
4. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
6. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
7. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
8. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
9. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
10. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
11. Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

Our experienced staff will be pleased to discuss the practical and theoretical aspects of the LAL test. Please call if you have problems using Pyrotell. We will replace any of our products that do not perform to product specifications; you must notify us before returning product.

Français

LYSAT D'AMOEBOCYTES DE LIMULE

PYROTELL®

Flacon à essais multiples
pour la détection et la détermination quantitative d'endotoxines bactériennes à Gram négatif (lipopolysaccharides)

Lorsque l'essai sur lysat d'amoebocytes de limule (LAL) est effectué conformément aux directives de la FDA, il peut remplacer le test de dépistage des pyrogènes (de lapin) de la pharmacopée américaine lors d'essais sur produits finis de « médicaments injectables aux humains (produits biologiques inclus), injectables aux animaux et de dispositifs médicaux ». L'essai LAL est recommandé pour la quantification d'endotoxines sur les matières premières utilisées en production, dont l'eau, et pour le contrôle en cours de fabrication des taux d'endotoxines. Le test d'endotoxines bactériennes de la pharmacopée américaine (2) est l'essai officiel mentionné dans certaines de ses monographies.

Résumé du test

Le lysat d'amoebocytes de *limule* est un extrait aqueux provenant des cellules sanguines (amoebocytes) du crabe « en fer à cheval », *Limulus polyphemus*. L'essai LAL est exécuté en ajoutant 0,1 mL de Pyrotell reconstitué à l'échantillon dans un tube à réaction en verre (à base de chaux sodée), dépyrogénéisé de 10 x 75 mm. Mélanger la solution réactionnelle et la placer immédiatement dans un bloc chauffant ou un bain Marie sans turbulence à une température de 37 ± 1°C pendant 60 ± 2 minutes. À la fin de la période d'incubation, enlever le tube du milieu d'incubation et le retourner. Si un gel s'est formé et reste intact au fond du tube après renversement à 180°, le test est positif : la concentration d'endotoxines dans le tube est supérieure ou égale à la sensibilité du Pyrotell. Tout autre état du mélange réactionnel constitue un test négatif indiquant une concentration d'endotoxines inférieure à la sensibilité du Pyrotell. Même si un gel se forme, mais se brise ou retombe lors du renversement du tube, le test est négatif. L'essai LAL est rapide, spécifique, facile à exécuter et extrêmement sensible. Le Pyrotell est capable de détecter des quantités aussi infimes que 0,03 unités d'endotoxines (EU) par mL pour la technique de gel point final.

Historique et principe biologique

Howell décrivit la coagulation du sang de la limule en 1885 (3). Dans les années 50, Bang a découvert, au Laboratoire de biologie marine de Woods Hole (Massachusetts), que les bactéries à Gram négatif provoquaient la coagulation du sang de la limule (4). Levin et Bang ont ensuite déterminé que cette réaction était enzymatique et engendrée par des enzymes situées dans des granules dans les amoebocytes (5). Ils ont démontré que la coagulation était déclenchée par un composant structurel unique de la paroi cellulaire bactérienne appelé endotoxine ou lipopolysaccharide (6). On sait actuellement que la coagulation découle d'une série de réactions en cascade des étapes d'activation enzymatique. Bien que l'on ne comprenne pas exactement la réaction complète, la dernière étape est bien décrite. La protéine de coagulation (coagulogène) est dissociée par l'enzyme de coagulation activée ; les produits de cette dissociation insolubles coagulent par interaction ionique pour former la trame du gel. De plus amples renseignements sur la réaction LAL et ses applications sont disponibles dans la littérature spécialisée (7, 8, 9).

Réactif

Le Pyrotell pour essai sur lysat d'amoebocytes de limule (LAL) est conditionné sous forme de préparation lyophilisée en flacons de 2 ou 5 mL. Le Pyrotell ne contient qu'un extrait aqueux d'amoebocytes de *L. polyphemus*, 1,5 % vol/vol de sérum-albumine humaine à 25 % (à titre de stabilisant), 3 % de NaCl et d'autres ions appropriés. Aucun conservateur, tampon ou autres additifs n'ont été ajoutés.

Associates of Cape Cod, Inc. présente des lots individuels de Pyrotell dont les sensibilités vont de 0,03 à 0,5 EU/mL établies avec l'étalon d'endotoxine de référence de la pharmacopée américaine (appelé également « reference endotoxin standard » ou RSE). La sensibilité, λ, représente la concentration minimale de RSE nécessaire pour produire un gel ferme dans des conditions standard. La sensibilité d'un lot, exprimée en EU/mL, apparaît sur le flacon et les étiquettes d'emballage. Préciser le niveau de sensibilité désiré lors du passage d'une commande.

Le Pyrotell ne doit être utilisé qu'à des fins de diagnostics in vitro. Ne pas l'utiliser pour la détection d'endotoxémie. La toxicité de ce réactif n'a pas été déterminée ; il convient donc d'être prudent lors de la manipulation du Pyrotell.

Reconstitution du Pyrotell:

1. Tapoter légèrement le flacon de Pyrotell pour faire tomber le LAL au fond du flacon. Enlever la bague de sertissage et casser le vide en soulevant le bouchon gris. Ne pas contaminer l'embouchure du flacon ; ne pas injecter à travers le bouchon ni le réutiliser. S'il reste une petite quantité de LAL sur le bouchon, l'essai ne sera pas faussé. Couvrir le flacon d'un parafilm « M »® (American National Can™) lorsqu'il n'est pas utilisé.
2. Reconstituer le Pyrotell avec de l'eau pour réactif LAL (LAL Reagent Water -LRW, voir la section « Réactifs pour essai ») ou du tampon compatible (Associates of Cape Cod, Inc.). Ajouter 2 ou 5 mL selon les indications inscrites sur l'étiquette du flacon. Les paillettes de LAL lyophilisées vont se solubiliser en quelques mi-nutes. Avant usage, mélanger avec précaution le contenu du flacon afin d'assurer son homogénéité. Un mélange trop vigoureux risque de provoquer un excès de mousse susceptible d'entraîner une perte de sensibilité.

Conditions de stockage

Le Pyrotell lyophilisé est relativement thermostable et, s'il reste réfrigéré, il peut conserver son activité complète jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon. Dès réception, stocker le produit entre -20 et +8°C. Les températures inférieures à -20°C font rétracter le bouchon, ce qui entraîne une perte de vide et la contamination possible du Pyrotell. Les températures supérieures à 37°C peuvent provoquer une détérioration rapide du Pyrotell lyophilisé, ce qui se manifeste par une perte de sensibilité et un jaunissement caractéristique du produit. Le Pyrotell est expédié entouré de pains réfrigérants dans un emballage thermiquement isolé pour le protéger des températures élevées.

Le Pyrotell reconstitué est généralement transparent et légèrement opalescent. Un lot peut parfois présenter une légère turbidité uniforme. La présence de petites fibres ou de fils n'indique pas une contamination et n'affecte pas son activité ; toutefois, une précipitation floconneuse ou une couleur jaune caractéristique indique sa détérioration.

Le Pyrotell reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé ; les flacons peuvent être conservés pendant 24 heures maximum à une température comprise entre 2 et 8°C. Le Pyrotell reconstitué peut être congelé une seule fois. Il peut conserver son activité pendant trois mois s'il est immédiatement congelé après reconstitution et maintenu à une température inférieure à -20°C. Une fois décongelé, les mêmes critères visuels de qualité s'appliquent que pour la reconstitution initiale.

Prélèvement des échantillons et préparation

Les échantillons doivent être prélevés aseptiquement dans des récipients apyrogènes. L'usage de récipients en verre dépyrogénéisé réutilisables ou en plastique polystyrène stériles et jetables est recommandé afin de minimiser l'adsorption d'endotoxines à la surface des récipients. Les récipients en plastique ne sont pas tous dépourvus d'endotoxines détectables et une substance provenant de certains d'entre eux risque de compromettre l'action de l'essai LAL. Rincer éventuellement les récipients (sélectionnés au hasard dans un lot) avec un petit volume de LRW (à température ambiante pendant une heure) et tester le liquide de rinçage comme un échantillon afin de déterminer si le lot de récipients est acceptable.

Le pH du mélange réactionnel (un échantillon ajouté au Pyrotell) doit se situer entre 6 et 8. Ajuster le pH de l'échantillon avec HCl ou NaOH (sans endotoxine détectables) ou tampon compatible (voir #3 ci-dessous). Diluer du HCl concentré ou de la NaOH avec de l'eau pour réactif LAL à des normalités qui n'entraîneront pas de dilution importante de l'échantillon lors de son ajustement. Ne pas ajuster le pH d'une solution saline non tamponnée ou d'eau.

Les substances qui dénaturent les protéines, chélatent les cations, lient les endotoxines ou altèrent leur liaison hydrophobe risquent d'interférer sur l'essai. Cette interférence peut être détectée par la récupération d'une quantité d'endotoxines considérablement plus grande ou plus petite que celle attendue quand une quantité connue d'étalon d'endotoxine est ajoutée à l'échantillon (voir les « Limites de la méthode »). Dans la plupart des cas, la dilution de l'échantillon tend à réduire la concentration et l'activité des substances interférantes, et produit quand même des résultats de tests valides. Les contrôles appropriés et les modes de dilution sont décrits à la section « Protocole opératoire ».

Il convient de tester les échantillons aussi rapidement que possible après prélèvement. Il est conseillé de congeler un échantillon non stérile qui doit être conservé ou expédié avant l'essai. Les échantillons censés contenir de faibles concentrations d'endotoxines (inférieures à 1 EU/mL) doivent être testés afin de vérifier la perte d'endotoxines lors du stockage.

Protocole

Réactifs d'essai

1. *Flacon de Pyrotell à essais multiples* (voir la description et la méthode de reconstitution à la section précédente).
2. *LRW* (eau pour réactif à LAL), non fournie avec Pyrotell ; doit être commandée séparément. Le Pyrotell lyophilisé doit être reconstitué avec de l'eau qui ne présente pas d'endotoxines détectables au cours de l'essai LAL. Les sources recommandées comprennent le produit d'Associates of Cape Cod, Inc., ou de l'eau stérile pour injection ou irrigation conforme à la pharmacopée américaine (USP) (eau ppi sans bactériostatique). La limite d'endotoxines pour cette eau stérile USP est de 0,25 EU/mL ; cette eau peut donc présenter un taux d'endotoxines détectable lorsqu'elle est testée au moyen d'un Pyrotell plus sensible. Pour vérifier qu'un nouveau lot d'eau est conforme à la LRW requise, reconstituer le Pyrotell et réaliser des dilutions d'étalon d'endotoxine avec le nouveau lot d'eau pour confirmer la sensibilité du Pyrotell. Si la sensibilité d'essai du lot est confirmée et que le contrôle négatif ne présente pas d'augmentation de viscosité ou de précipitation floconneuse, l'eau convient à l'usage prévu. Utiliser LRW pour reconstituer le Pyrotell et les étalons d'endotoxines ainsi que pour diluer ces étalons et les échantillons.
3. *Tampon*, non fourni avec le Pyrotell ; à commander séparément si nécessaire. On peut avoir recours au tampon Pyrosol (CAt# BR051 ou BC0554) ou tampon Glucashield™ (Cat# GB051) plutôt qu'à LRW en vue de reconstituer le Pyrotell afin d'éliminer un problème de pH dans un échantillon ou interférence des glucanes.
4. *Étalon d'endotoxine*, non fourni avec le Pyrotell ; doit être commandé séparément. Utiliser l'étalon d'endotoxine Control Standard Endotoxin, « CSE ») d'Associates of Cape Cod, Inc. pour confirmer la sensibilité du Pyrotell, valider le produit et préparer les contrôles d'inhibition. Chaque flacon contient un poids d'endotoxines mesuré. On peut obtenir l'étalon d'endotoxine de référence USP auprès de la U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Suivre les directives du fabricant relatives à la reconstitution et au stockage des étalons d'endotoxine. Les lots d'étalons d'endotoxine peuvent présenter des puissances différentes (EU/ng) lorsqu'ils sont testés avec différents lots de Pyrotell. Demander un Certificat d'analyse pour l'activité d'un étalon d'endotoxines (CSE) avec un lot particulier de Pyrotell.

Matériel et équipement requis (non fournis)

1. *Tubes à réaction*, 10 x 75 mm, dépyrogénéisés, en verre (Cat# TS050) (à base de chaux sodée). Certaines marques présentent des propriétés inhibitrices avec certains lots de Pyrotell. Des tubes dépyrogénéisés sont disponibles auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.
2. *Bain Marie sans turbulence* ou bloc chauffant (Cat# TH120) capable de maintenir une température de 37 ± 1°C.
3. *Portoir pour tenir* et/ou incuber les tubes à réaction.
4. *Pipettes*, pipettes automatiques à embout de prélèvement ou multipipettes avec seringue en plastique. Des instruments stériles jetables sont recommandés.
5. *Vortex.*
6. *Parafilm « M »®* Le côté en contact avec le papier est généralement apyrogène.
7. *Tubes à essai apyrogènes* à contenance suffisante pour réaliser des dilutions d'étalon d'endotoxine ou d'échantillons (les tubes à essai en verre de 18 x 150 mm à fermeture Morton en acier inoxydable sont pratiques et réutilisables). Consulter la section « Prélèvement d'échantillons et préparation » pour la liste des autres récipients utilisables pour les dilutions.
8. *Four à chaleur sèche* avec une capacité de 250°C pour la dépyrogénéisation des récipients en verre. Températures et temps de réaction minimum habituellement utilisés: 30 minutes à 250°C. (2, 11).

Contrôles

Utiliser obligatoirement des contrôles pour assurer la validité de l'essai. Les méthodes recommandées sont décrites en détail par la FDA (1) et l'USP (pharmacopée américaine) (2).

1. **Contrôles d'endotoxines**

   a. **Gamme étalon d'endotoxine**. Préparer chaque jour une nouvelle série de dilutions à partir de la solution mère d'endotoxine. Effectuer les dilutions de façon à ce qu'une série finale de dilutions au 1 : 2 encadre la sensibilité (λ) du Pyrotell. Des concentrations de 2λ, λ, 0,5λ et 0,25λ sont recommandées pour confirmer la sensibilité du Pyrotell. Réduire autant que possible les dilutions et utiliser des volumes de pipette corrects afin d'augmenter au maximum la précision.

   b. **Contrôles positifs**. Dans certaines circonstances, on peut utiliser des contrôles positifs en l'absence d'une gamme de concentrations étalon. Pour de plus amples détails, consulter la directive de la FDA (1) à la section « Essais systématiques sur médicaments à l'aide de l'essai LAL ». La concentration du contrôle positif doit être 2λ.

   c. Les **contrôles de produit positifs** sont des contrôles d'inhibition et se composent de l'échantillon ou de la dilution de l'échantillon à laquelle on ajoute de l'étalon d'endotoxine. La concentration finale des endotoxines ajoutée dans l'échantillon doit être de 2λ.
2. **Contrôles négatifs**

   De(s) contrôle(s) négatif(s) de LRW doivent être inclus avec chaque lot d'échantillons testés. Lors de la validation du produit ou des tests d'inhibition/activation (1, 2), traiter l'échantillon utilisé pour diluer l'étalon d'endotoxine comme un contrôle négatif.

Préparation de l'échantillon pour le test ou l'essai limite

Diluer l'échantillon à la concentration requise en exécutant un test (succès/échec) ou effectuer un essai en testant une série de concentrations (des exemples de ces deux types de tests sont fournis à la section « Résultats et interprétation »). Effectuer les dilutions dans des tubes à essai et transférer le volume à tester dans les tubes à réaction, ou pratiquer les dilutions directement dans les tubes à réaction afin de laisser le volume à tester (0,1 mL) dans chaque tube. La dilution testée pour un test limite est déterminée par la sensibilité du Pyrotell et la limite d'endotoxines pour l'échantillon. Consulter les « Limites de la méthode » ou la directive de la FDA (1) pour l'explication et le calcul de la concentration valide minimale et de la dilution valide maximale.

Exécution du test

On doit faire appel à une **technique cohérente** pour obtenir des résultats satisfaisants.

1. Ajouter 0,1 mL de Pyrotell reconstitué à chaque tube à réaction contenant 0,1 mL d'échantillon ou de contrôle. Employer une pipette graduée (graduations de 0,1 mL) ou une pipette automatique ou multipipette. Ajouter d'abord le Pyrotell au(x) contrôle(s) négatif(s), en allant de la plus faible concentration à la plus élevée dans chaque série de tests où une contamination peut être un problème. Utiliser une nouvelle pipette ou un nouvel embout de pipette pour chaque prélèvement dans le flacon de Pyrotell. Secouer vigoureusement le portoir pendant 20 à 30 secondes pour effectuer le mélange. S'il ne s'agit que de quelques tubes, ils peuvent être individuellement mélangés au vortex pendant 1 à 2 secondes. Un mélange insuffisant est souvent la cause de tests défectueux.
2. Placer les tubes à réaction dans un bain Marie ou un bloc chaufant à une température de 37 ± 1°C pendant 60 ± 2 minutes. La réaction commence lorsque le LAL est ajouté à l'échantillon mais se poursuit à une vitesse optimale que lorsque le mélange atteint 37°C. Si un grand nombre d'échantillons sont testés en parallèle, les essais devraient être traités en lots et commencés à intervalles permettant leur lecture individuelle dans le délai permis.

   Ne pas bousculer les tubes à réaction pendant la période d'incubation. La réaction de formation du gel est délicate et risque d'être interrompue de manière irréversible si les tubes sont manipulés, agités ou soumis à des vibrations. Ne pas employer de bain Marie à turbulence ou d'autre système émettant des vibrations. Immerger les tubes au-dessus du niveau du mélange à réaction mais pas à une profondeur entraînant leur flottement ou leur déplacement dans les portoirs.
3. Enlever les tubes à réaction et lire les résultats les uns après les autres. Ne pas essuyer les tubes ni les cogner contre le bord du portoir lors de leur retrait. Retourner le tube d'un seul coup ; ne pas s'arrêter à mi-chemin à moins qu'il ne soit évident que le gel ne s'est pas formé. Un test positif est indiqué par la formation d'un gel qui ne s'écoule pas lorsque le tube est retourné.

Résultats et interprétation

Exemple d'une gamme étalon d'endotoxine

Confirmer la sensibilité du Pyrotell et qualifier le laboratoire ou le technicien en exécutant l'essai LAL sur une gamme étalon d'endotoxine de concentrations connues (1, 2) qui encadre la sensibilité indiquée sur l'étiquette (c'est-à-dire, 2λ, λ, 0,5λ et 0,25λ). Pour cet exemple, la sensibilité du Pyrotell (λ) est de 0,25 EU/mL :

Concentration d'endotoxines	*Résultat du test*
0,5 EU/mL (2λ)	+
0,25 EU/mL (λ)	+
0,125 EU/mL (0,5λ)	–
0,06 EU/mL (0,25λ)	–
LRW (contrôle négatif)	–

Le point final de cet essai est défini comme la plus petite concentration d'endotoxines donnant un test positif. La sensibilité indiquée sur l'étiquette du Pyrotell est confirmée si le point final correspond à λ plus ou moins une dilution au 1 : 2. Dans cet exemple, la concentration d'endotoxine dans le dernier tube positif de la série est de 0,25 EU/mL ou λ; la sensibilité est donc confirmée. Le test serait valide (la sensibilité confirmée) si le point final était compris entre 0,125 et 0,5 EU/mL (l'erreur de la méthode). Pour présenter un point final de 0,125 EU/mL, la concentration de 0,06 EU/mL doit être présente dans la gamme et le résultat négatif.

Lorsque l'essai LAL est répété, la sensibilité est exprimée comme la moyenne géométrique (MG) des sensibilités individuelles :

$$MG = \text{antilog}\ ((\Sigma e)/f)$$

où Σe = la somme des log des points finaux, et f = le nombre de points finaux répétés.

Le **contrôle négatif** de LRW devrait produire un test négatif. Si le contrôle négatif se coagule, LRW, le récipient ou le Pyrotell est contaminé. Le mélange doit être transparent, sans augmentation de viscosité. Une précipitation « en flocons » ou floconneuse indique une concentration d'endotoxine inférieure à la sensibilité du Pyrotell.

En l'absence de la gamme étalon d'endotoxines (1), il est possible d'inclure un **contrôle positif** aux tests. Dans l'exemple ci-dessus, le contrôle positif à 2λ correspond à la concentration 0,5 EU/mL. Si le contrôle positif se révèle négatif, la sensibilité du Pyrotell est inférieure à deux fois la sensibilité indiquée sur l'étiquette et l'échantillon est faussé. Une perte de sensibilité peut signifier que le Pyrotell s'est détérioré, que les endotoxines ont perdu leur activité (souvent en raison de leur adsorption à la surface du récipient) ou que l'essai n'a pas été correctement effectué.

Exemple d'un test limite (succès/échec)

Il est possible de tester une concentration d'échantillon au moyen d'une sensibilité donnée de Pyrotell et d'avoir un résultat indiquant si l'échantillon présente un taux d'endotoxine inférieur ou supérieur à sa limite. Dans cet exemple, la concentration de l'échantillon est 1 mg/mL et la limite d'endotoxine désirée ou prédéterminée pour l'échantillon est de 3 EU/mg (voir la section « Limites de la méthode »). La limite exprimée en EU/mL, soit

$$(3\ \text{EU/mg})\ (1\ \text{mg/mL}) = 3\ \text{EU/mL},$$

est supérieure à la sensibilité du Pyrotell, 0,25 EU/mL, ce qui signifie que l'échantillon doit être dilué pour effectuer un test succès/échec. Déterminer la dilution d'échantillon qui indique un succès, <3 EU/mL, ou un échec, ≥3 EU/mL, en divisant la limite d'endotoxine exprimée en EU/mL par la sensibilité du LAL :

$$3\ \text{EU/mL} : 0{,}25\ \text{EU/mL} = 12.$$

Associer un volume d'échantillon avec 11 volumes de LRW pour obtenir la dilution au 1 : 12 et la tester. Le résultat indiquera si l'échantillon réussit au test avec la limite de 3 EU/mL. Inclure les contrôles de produit positifs à la dilution de l'échantillon afin d'éliminer de faux résultats négatifs.

Exemple d'essai sur échantillon

Quantifier les endotoxines dans un essai en établissant le point final dans une série de dilutions de l'échantillon. Dans l'exemple ci-dessous, l'échantillon est dilué avec LRW et les dilutions dans le tableau sont testées ; λ est égal à 0,25 EU/mL. Les résultats sont marqués par positif et négatif.

Dilution de l'échantillon	*Résultat du test*
non dilué	+
1 : 2	+
1 : 4	+
1 : 8	–
1 : 16	–
1 : 32	–
contrôle négatif	–

Pour calculer la concentration d'endotoxines dans l'échantillon, multiplier la sensibilité du Pyrotell (λ) par l'inverse du facteur de dilution au point final:

$$\text{Conc.} = (\lambda)\ (4/1) = (0{,}25\ \text{EU/mL})\ (4) = 1\ \text{EU/mL}$$

Lorsqu'il s'agit d'essais répétés, la concentration est exprimée sous forme de moyenne géométrique.

Un **contrôle du produit positif** (échantillon surchargé de 2λ d' étalon d'endotoxine) doit être présent et testé positif pour éliminer de faux résultats négatifs. Si le contrôle de produit positif est négatif et que le contrôle positif est positif, l'échantillon interfère (ou inhibe) l'action de l'essai LAL. Dans ce cas, tester de nouveau l'échantillon à un niveau de dilution plus élevé (ne pas dépasser la dilution valide maximale ; voir les « Limites de la méthode »).

Limites de la méthode

La méthode est limitée par la capacité de l'échantillon à inhiber ou à activer l'essai LAL. Si la méthode ne peut pas être validée (1, 2) à une concentration d'échantillon qui est supérieure à la concentration valide minimale, on ne peut pas remplacer le test de dépistage des pyrogènes de la pharmacopée américaine par l'essai LAL. La concentration valide minimale se calcule comme suit :

$$\frac{(\lambda)\ (\text{dose échantillon})}{\text{limite tolérée en endotoxines}}$$

où λ est exprimée en EU/mL, la dose échantillon en unités par kg de poids corporel et la limite tolérée en endotoxines en EU/kg.

La dilution valide maximale est la dilution de l'échantillon contenant la concentration valide minimale (1). Elle se calcule par la concentration initiale de l'échantillon divisée par la concentration valide minimale.

La limite tolérée en endotoxines (1) est de 0,2 EU/kg lorsqu'il s'agit de médicaments à administration par voie intrathécale et de 5 EU/kg lorsqu'il s'agit d'une administration parentérale. La limite pour les dispositifs médicaux est exprimée par mL d'un volume d'extraction ou d'un volume de rinçage obtenus conformément à la directive de la FDA (1). En ce qui concerne des dispositifs qui entrent en contact avec le liquide céphalo-rachidien, la limite est de 0,06 EU/mL ; pour tous les autres, elle est 0,5 EU/mL. La limite pour les dispositifs liquides est la même que celle se rapportant aux médicaments.

La trypsine provoque un faux résultat positif à moins qu'elle ne soit dénaturée par traitement thermique avant l'essai. Les substances telles que le sang, le sérum et le plasma doivent être traitées afin d'inactiver les inhibiteurs avant d'être testées (12).

Valeurs probables

Les endotoxines peuvent être quantifiées si leur concentration est supérieure ou égale à la sensibilité du Pyrotell. Les substances dérivées de sources biologiques, même après avoir subi une purification biochimique, peuvent contenir des taux d'endotoxines mesurables. L'eau obtenue par un procédé de distillation, osmose reverse ou ultrafiltration peut contenir moins d'endotoxines que le niveau détectable tant que le procédé de purification fonctionne correctement et que l'eau n'est pas contaminée après la production.

Caractéristiques de performance spécifiques

L'erreur de la méthode point final est plus ou moins une dilution au 1 : 2 au point final de l'essai.

Bibliographie

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, Current USP.
3. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of Limulus polyphemus, Callinectes hastatus, and Cucumaria sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
4. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
5. Levin, J., et F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
6. Levin, J., et F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
7. Levin, J., et F. B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
8. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
9. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, et T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
10. Tsuji, K. et S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
11. Sweet, B. H. et J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. Dans : Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. Dans : Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

Notre personnel expérimenté est à votre disposition pour répondre à vos questions sur les aspects pratiques et théoriques de l'essai LAL. N'hésitez pas à nous téléphoner si vous avez des difficultés pour utiliser le Pyrotell. Nous remplacerons tout produit non conforme à ses spécifications. Vous devez nous avertir avant de renvoyer un produit.

Deutsch

LIMULUS AMÖBOZYTEN-LYSAT

PYROTELL®

Multitest-Fläschchen
für den Nachweis und die Quantifizierung von gramnegativen Bakterien-Endotoxinen (Lipopolysacchariden)

Der *Limulus* Amöbozyten-Lysat- (LAL) Test kann anstelle des US Pharmacopeia- (USP) Pyrogentests (Kaninchenfiebertests) als Endprodukt-Test von „Arzneimitteln, die in Mensch und Tier injiziert werden können (einschließlich biologischer Produkte), sowie von Medizinprodukten" verwendet werden, wenn dieser gemäß den Richtlinien der FDA (Food and Drug Administration, US-Bundesbehörde für Lebens- und Arzneimittel) (1) angewandt wird. Der LAL-Test wird für die Quantifizierung von Endotoxinen in Rohstoffen, die bei der Herstellung verwendet werden, einschließlich Wasser, und für In-Prozeßkontrollen des Endotoxingehalts empfohlen. Der LAL-Röhrchentest (USP Bacterial Endotoxins Test) (2) ist der offizielle Test, der in spezifischen USP-Monographien als Bezug herangezogen wird.

Zusammenfassung des Tests

Limulus Amöbozyten-Lysat ist ein wäßriger Extrakt von Blutzellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebses, *Limulus polyphemus*. Der LAL-Test wird durchgeführt, indem einer Testprobe von 0,1 mL in einem 10 x 75 mm großen, pyrogenfreien Reaktionsröhrchen aus AR-Glas (Natriumkarbonat) 0,1 mL rekonstituiertes Pyrotell hinzugefügt wird. Die Reaktionslösung wird gründlich gemischt und umgehend 60 ± 2 Minuten bei 37°C ± 1°C in einen Wärmeblock oder ein nichtzirkulierendes Wasserbad gestellt. Nach der Inkubationszeit wird das Röhrchen aus dem Inkubator genommen und um 180° invertiert. Wenn sich ein Gel gebildet hat und ungestört am Boden des Reaktionsröhrchens verbleibt, nachdem dieses gekippt wurde, ist der Test positiv; die Konzentration des Endotoxins im Röhrchen ist höher als oder gleich der Pyrotell-Empfindlichkeit. Sämtliche anderen Zustände der Reaktionsmischung stellen ein negatives Testergebnis dar und zeigen eine Endotoxin-Konzentration an, die geringer ist als die Pyrotell-Empfindlichkeit. Selbst wenn sich ein Gel gebildet hat, dieses jedoch bei der Umkehr um 180° flüssig wird oder zusammenfällt, ist der Test negativ. Der LAL-Test ist schnell, spezifisch, leicht auszuführen und hochempfindlich. Mit Hilfe der Festgelmethode können durch Pyrotell geringe Konzentrationen von bis zu 0,03 Endotoxin-Units (EU) (Endotoxin-Einheiten, EE) pro mL festgestellt werden.

Vorgeschichte und biologisches Prinzip

Howell beschrieb die Koagulation von *Limulus*-Blut im Jahre 1885 (3). In den fünfziger Jahren entdeckte Bang im Labor für Meeresbiologie in Woods Hole im US-Bundesstaat Massachusetts, daß gramnegative Bakterien die Koagulation von *Limulus*-Blut verursachen (4). Levin und Bang stellten später fest, daß die Reaktion enzymatisch ist, und sich die Enzyme in den Granula der Amöbozyten befinden (5). Sie zeigten, daß die Gerinnung durch eine einzigartige strukturelle Komponente der Bakterienzellwand, Endotoxin oder Lipopolysaccharid (6) genannt, in Gang gesetzt wurde. Heute wird allgemein angenommen, daß eine kaskadenartig ablaufende Reaktion enzymatischer Aktivierungsschritte zur Gerinnselbildung führt. Obwohl die komplette Reaktion noch nicht vollständig erforscht ist, wird der letzte Schritt ausführlich beschrieben. Gerinnungsprotein (Koagulogen) wird durch aktiviertes Gerinnungsenzym gespalten. Die unlöslichen Spaltprodukte vereinigen sich in einer ionischen Wechselwirkung und bilden die Gel-Matrix. Weitere Informationen zur LAL-Reaktion und ihren Anwendungen können der Literatur entnommen werden (7, 8, 9).

Reagenz

Pyrotell *Limulus* Amöbozyten-Lysat (LAL) wird in lyophilisierter Form in Fläschchen der Größen 2 und 5 mL abgefüllt. Pyrotell enthält nur einen wäßrigen Extrakt von Amöbozyten des *L. polyphemus*, 1,5 v/v von 25%igem Humanalbumin (Stabilisator), 3 % NaCl sowie andere geeignete Ionen. Es wurden keine Konservierungsstoffe, Pufferlösungen oder andere Zusatzmittel hinzugefügt.

Associates of Cape Cod, Inc. bietet einzelne Chargen Pyrotell mit Empfindlichkeiten von 0,03 bis 0,5 EU/mL basierend auf dem USP-Endotoxin-Standard (auch Reference Standard Endotoxin oder RSE genannt) an. Empfindlichkeit (λ) ist die Mindestkonzentration von RSE, die unter normalen Bedingungen ein festes Gel produziert. Die Empfindlichkeit der Charge, EU/mL, ist auf dem Fläschchen und auf den Verpackungsetiketten aufgedruckt. Beim Bestellen sollte die gewünschte Empfindlichkeit angegeben werden.

Pyrotell ist nur für diagnostische Zwecke in vitro zu verwenden. Es darf nicht zum in-vivo Nachweis einer Endotoxämie verwendet werden. Die Toxizität dieses Reagenz wurde noch nicht bestimmt. Aus diesem Grund sollte Pyrotell vorsichtig gehandhabt werden.

Pyrotell folgendermaßen rekonstituieren:

1. Vorsichtig auf das Pyrotell-Fläschchen klopfen, damit loses LAL auf den Boden des Fläschchens fällt. Die Bördeldichtung entfernen und das Vakuum brechen, indem der graue Stöpsel abgenommen wird. Die Öffnung des Fläschchens nicht kontaminieren; nicht durch den Stöpsel injizieren oder diesen wiederverwenden. Eine kleine Menge LAL, die am Stöpsel zurückbleibt, hat keine negativen Auswirkungen auf den Test. Das Fläschchen mit Parafilm „M"® (American National Can™) verschließen, wenn es nicht in Gebrauch ist.
2. Pyrotell in LAL-Reagenzwasser (LRW, siehe „Test-Reagenz") oder einer kompatibler Puffer (Associates of Cape Cod, Inc.) auflösen. 2,0 oder 5,0 mL hinzufügen, wie auf dem Fläschchen angegeben. Der Inhalt löst sich innerhalb von wenigen Minuten auf. Vor der Benutzung den Inhalt des Fläschchens zur Gewährleistung der Homogenität vorsichtig mischen. Ein zu kraftvolles Mischen kann zu übermäßiger Schaumbildung führen, die wiederum einen Verlust der Empfindlichkeit verursachen kann.

Lagerungsbedingungen

Gefriergetrocknetes Pyrotell ist relativ hitzestabil und behält bei kühler Lagerung seine volle Aktivität bis nach Ablauf des Verfallsdatums auf dem Fläschchenetikett. Das Produkt nach Erhalt bei einer Temperatur von -20°C bis +8°C lagern. Temperaturen unter -20°C haben eine Schrumpfung des Stöpsels und einen Vakuumverlust sowie eine mögliche Kontamination des Pyrotells zur Folge. Temperaturen über 37 °C können zum schnellen Verfall des lyophilisierten Pyrotells führen. Dies wird durch einen Empfindlichkeitsverlust und eine ausgeprägte Gelbfärbung des Produkts angezeigt. Pyrotell wird mit Kühlpackungen in isolierten Behältern geliefert, um das Produkt gegen hohe Temperaturen zu schützen.

Rekonstituiertes Pyrotell ist gewöhnlich klar und leicht opalisierend. Gelegentlich zeigen Chargen eine leichte gleichmäßige Trübung. Das Vorhandensein von kleinen Fasern oder Strängen deutet nicht auf Kontamination hin und beeinträchtigt die Aktivität nicht. Ausflocken oder eine ausgeprägte gelbliche Farbe zeigen jedoch eine Kontamination an.

Rekonstituiertes Pyrotell ist weniger stabil als das gefriergetrocknete Produkt; Fläschchen können bis zu 24 Stunden lang bei 2 bis 8°C aufbewahrt werden. Rekonstituiertes Pyrotell kann einmal eingefroren werden. Das Produkt behält seine Aktivität für die Dauer von 3 Monaten, wenn es umgehend nach der Rekonstitution eingefroren und bei einer Temperatur von -20°C oder weniger aufbewahrt wird. Nach dem Auftauen gelten die gleichen visuellen Qualitätskriterien wie für die erstmalige Rekonstitution.

Sammlung und Vorbereitung der Proben

Untersuchungsproben sollten aseptisch in pyrogenfreien Behältern gesammelt werden. Es werden wiederverwendete, entpyrogenierte Glaswaren oder sterile, wegwerfbare Polystyrolbehälter empfohlen, um die Adsorption von Endotoxin an die Oberfläche des Behälters auf ein Minimum zu reduzieren. Nicht alle Plastikbehälter sind frei von nachweisbarem Endotoxin, und eine extrahierbare Substanz einiger Typen kann mit dem LAL-Test interferieren. Die Behälter (die nach dem Zufallsprinzip aus einer Partie gewählt wurden) können mit einem kleinen Volumen LRW (eine Stunde lang bei Zimmertemperatur) inkubiert werden. Daraufhin wird dieses Wasser als Probe getestet, um zu bestimmen, ob die Partie akzeptabel ist.

Der pH-Wert der Reaktionsmischung (Pyrotell mit hinzugefügter Probe) sollte zwischen 6 und 8 liegen. Den pH-Wert der Probe mit HCl oder NaOH (frei von nachweisbarem Endotoxin) oder kompatibler Pufferlösung einstellen (sehen Sie 3 unten). Konzentriertes HCl oder NaOH mit LRW auf eine Normalität verdünnen, die beim Einstellen nicht zu einer signifikanten Verdünnung der Testprobe führt. Der pH-Wert von ungepufferter Kochsalzlösung oder Wasser ist nicht einzustellen.

Substanzen, die Proteine denaturieren, mit Kationen Chelate bilden, Endotoxine binden oder den hydrophoben Zustand des Endotoxins ändern, können mit dem Test interferieren. Interferenzen können festgestellt werden, indem signifikant mehr oder weniger Endotoxin als erwartet wiedergefunden wird, wenn der Probe eine bekannte Menge von Standard-Endotoxin hinzugefügt wurde (siehe „Beschränkungen des Verfahrens"). In den meisten Fällen jedoch reduziert die Verdünnung der Probe die Konzentration und Aktivität der interferierenden Substanzen und ergibt gültige Testergebnisse. Entsprechende Kontrollen und Verdünnungsschemata werden unter „Testverfahren" erörtert.

Proben sollten möglichst bald nach der Sammlung getestet werden. Es ist ratsam, eine unsterile Probe, die vor dem Test gelagert oder versandt wird, einzufrieren. Proben, bei denen geringe Konzentrationen von Endotoxin (weniger als 1 EU/mL) erwartet werden, sollten auf Verlust von Endotoxin während der Lagerung getestet werden.

Testverfahren

Testreagenzien

1. *Pyrotell-Multitest-Fläschchen* (siehe Beschreibung und Methode der Rekonstitution im oberen Abschnitt).
2. *LRW* wird nicht mit Pyrotell geliefert und muß separat bestellt werden. Lyophilisiertes Pyrotell muß mit Wasser rekonstituiert werden, das kein nachweisbares Endotoxin im LAL-Test anzeigt. Empfohlene Bezugsquellen: Associates of Cape Cod, Inc., oder USP Sterile Water for Injection or Irrigation (WFI, ohne Bacteriostatica). Der Endotoxin-Grenzwert für USP WFI beträgt 0,25 EU/mL; aus diesem Grund kann WFI nachweisbares Endotoxin enthalten, wenn es mit einem empfindlicheren Pyrotell getestet wird. Um eine neue Charge Wasser als LRW zu deklarieren, Pyrotell rekonstituieren und Verdünnungen von Standard-Endotoxin mit der neuen Charge Wasser ansetzen, um die Empfindlichkeit von Pyrotell zu bestätigen. Wenn die Empfindlichkeit der Charge bestätigt wurde und die Negativkontrolle keine Steigerung der Viskosität und keine Ausflockung anzeigt, ist das Wasser zum Gebrauch geeignet. LRW verwenden, um Pyrotell und Endotoxin-Standards zu rekonstituieren und Endotoxin-Standards und Proben zu verdünnen.
3. *Pufferlösung* wird nicht mit Pyrotell geliefert und muß separat bestellt werden. Pyrosol-Pufferlösung (Cat# BR051 or BC554) oder Glucashield™ Pufferlösung (Cat# GB051) kann anstelle von LRW zur Rekonstitution von Pyrotell verwendet werden, um Probleme mit dem pH-Wert oder Störung von den Glukanen..
4. *Standard-Endotoxin* wird nicht mit Pyrotell geliefert und muß separat bestellt werden. Control Standard Endotoxin (Kontroll-Standard-Endotoxin, CSE) von Associates of Cape Cod, Inc., wird verwendet, um die Empfindlichkeit von Pyrotell zu bestätigen, das Produkt zu validieren und die Inhibitionskontrollen vorzubereiten. Jedes Fläschchen enthält eine definierte Menge Endotoxin. Der USP Endotoxin-Standard ist von der US-Pharmacopeial Convention, Inc. erhältlich. Die Anweisungen des Herstellers zur Rekonstitution und zur Lagerung von Standard-Endotoxin befolgen. CSE-Chargen zeigen u. U. unterschiedliche Aktivität (EU/ng), wenn sie mit verschiedenen Chargen von Pyrotell getestet werden. Ein Analysenzertifikat für die Aktivität des CSE mit einer bestimmten Charge von Pyrotell anfordern.

Materialien und Geräte (nicht mitgeliefert

1. *Reaktionsröhrchen*, 10 x 75 mm, pyrogenfrei, aus AR-Glas (Cat# TS050) (Natriumkarbonat). Einige Marken zeigen inhibitorische Eigenschaften mit bestimmten Chargen von Pyrotell. Pyrogenfreie Röhrchen sind von Associates of Cape Cod, Inc. erhältlich.
2. *Nichtzirkulierendes Wasserbad* oder Wärmeblock-Inkubator (Cat# TH120), der eine Temperatur von 37 ± 1°C halten kann.
3. Reagenzglasständer, mit denen die Reaktionsröhrchen gehalten und/oder inkubiert werden können.
4. *Pipetten*, Eppendorf-Pipetten mit Einmal-Pipettenspitzen oder Kontrollpipetten mit Spritzenzylinder aus Kunststoff. Sterile Einwegmaterialen werden empfohlen.
5. *Vortex.*
6. *Parafilm „M"®* Die Seite, die mit dem Papier in Kontakt kommt, ist gewöhnlich pyrogenfrei.
7. *Pyrogenfreie Teströhrchen* mit ausreichender Kapazität zur Herstellung von Verdünnungen von Endotoxin-Standards oder Test-Untersuchungsproben (18 x 150 mm Teströhrchen aus Glas mit einem Morton-Verschluß aus Edelstahl sind wiederverwendbar und zweckdienlich). Siehe „SammLung und Vorbereitung der Untersuchungsproben" für weitere Behälter, die für die Verdünnung geeignet sind.
8. *Heißluftofen* mit einer Kapazität von 250°C für die Entpyrogenierung von Glaswaren. Allgemein gebräuchliche, minimale Einstellungen der Zeit und der Temperatur sind: 30 Minuten bei 250°C.

Kontrollen

Kontrollen sind notwendig, um einen gültigen Test zu gewährleisten. Empfohlene Verfahren werden im Detail von der FDA (1) und USP (2) beschrieben.

1. **Endotoxin-Kontrollen**

   a. **Endotoxin-Standard-Serie**. Jeden Tag eine frische Standardreihe von Verdünnungen der angesetzten Endotoxin-Lösung herstellen. Die Verdünnungen so ansetzen, daß bei der fertigen Standardreihe die Empfindlichkeit (λ) des Pyrotells von jeweils zwei Verdünnungsstufen eingeschlossen wird. Es werden Konzentrationen von 2λ, λ, 0.5λ und 0.25λ empfohlen, um die Empfindlichkeit von Pyrotell zu bestätigen. Sowenige Verdünnungen wie möglich mit dem entsprechenden Pipetten-Volumen verwenden, um die Genauigkeit zu erhöhen.

   b. Unter bestimmten Umständen können **Positivkontrollen** in Abwesenheit von Standardreihen verwendet werden. Einzelheiten dazu können der FDA-Richtlinie (1) unter „Routine Testing of Drugs by the LAL Test" (Routine Testen von Arzneimitteln mit Hilfe des LAL-Tests) entnommen werden. Die Konzentration bei Positivkontrollen sollte 2λ betragen.

   c. **Positive Produktkontrollen** sind Inhibitionskontrollen und bestehen aus der Probe bzw. der Verdünnung der Probe, der Standard-Endotoxin hinzugefügt wird. Die Endkon zentration des hinzugefügten Endotoxins in der Probe sollte 2λ betragen.
2. **Negativkontrollen**

   LRW Negativkontrolle(n) sollte(n) in jeder Testserie der Proben enthalten sein. Während der Produktvalidierung oder des Inhibitions-/Verstärkungstests (1, 2) wird die zur Verdünnung des Standard-Endotoxins verwendete Probe auch als Negativkontrolle behandelt.

Vorbereitung der Proben für Grenzwert-Test oder Analyse

Die Probe entweder auf die erforderliche Konzentration verdünnen, um einen Grenzwert-Test (Pass/Fail - Bestanden/Nicht bestanden) durchzuführen oder eine Analyse vornehmen, indem eine Verdünnungsreihe getestet wird (Beispiele für beide Testarten werden in „Ergebnisse und Interpretation" gegeben). Die Verdünnungen können in den Teströhrchen stattfinden und das Testvolumen wird dann in die Reaktionsröhrchen überführt oder die Verdünnungen können direkt in den Reaktionsröhrchen durchgeführt werden, damit das Testvolumen, 0,1 mL, in jedem Röhrchen verbleiben kann. Die Verdünnung für einen Grenzwert-Test wird durch die Empfindlichkeit des Pyrotells und den Endotoxin-Grenzwert für die Probe bestimmt. Erläuterungen hierzu und Berechnung der minimal zulässigen Konzentration (MZK - Minimum Valid Concentration; MVC) und der maximal zulässigen Verdünnung (MZV - Maximum Valid Dilution; MVD) sind dem Abschnitt „Beschränkungen des Verfahrens" oder den Richtlinien der FDA (1) zu entnehmen.

Durchführung des Tests

Eine **konsequente Methodik** ist erforderlich, um zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten.

1. Den einzelnen Reaktionsröhrchen mit 0,1 mL der Probe oder Kontrolle 0,1 mL rekonstituiertes Pyrotell hinzufügen. Eine Meßpipette (Teilstriche von 0,1 mL) oder einenautomatischen Pipettor verwenden. Pyrotell zuerst zu der/n negativen Kontrolle/n geben, dann bei jeder Testreihe, anfangen bei der niedrigsten bis zur höchsten Konzentration, bei der die Verschleppung von Tröpfchen ein Problem darstellen kann, hinzufügen. Eine unbenutzte Pipette oder Pipettenspitze wird für jedes Einführen in das Pyrotell-Fläschchen empfohlen. Den Reagenzglasständer 20 - 30 Sekunden lang kräftig schütteln, um sicherzustellen, daß der Inhalt gut vermischt wird. Wenn es sich nur um wenige Röhrchen handelt, kann jedes einzelne Röhrchen 1 bis 2 Sekunden lang im Vortex gemischt werden. Nicht zufriedenstellende Tests lassen sich oftmals auf unzureichendes Mischen zurückführen.
2. Die Reaktionsröhrchen für die Dauer von 60 ± 2 Minuten in ein Wasserbad oder einen Wärmeblock mit einer Temperatur von 37°C ± 1°C stellen. Die Reaktion beginnt, wenn der Untersuchungsprobe LAL hinzugefügt wird, läuft jedoch so lange nicht bei optimaler Geschwindigkeit ab, bis die Mischung 37°C erreicht hat. Wenn eine Vielzahl von Proben parallel getestet wird, sollten die Tests in Gruppen eingeteilt und in Intervallen gestartet werden, die das Ablesen innerhalb des Zeitlimits erlauben.

   Die Reaktionsröhrchen während der Inkubationszeit nicht stören! Die gelbildende Reaktion ist störanfällig und kann irreversibel beendet werden, wenn die Röhrchen angestoßen, hin- und herbewegt oder vibriert werden. Wasserbäder mit Rührern oder anderen Vibrationsquellen sind nicht zu verwenden. Die Röhrchen bis über den Spiegel der Reaktionsmischung eintauchen, jedoch nicht so tief, daß sie auf der Wasseroberfläche schwimmen oder sich im Ständer bewegen.
3. Die Reaktionsröhrchen nacheinander entfernen und beurteilen. Die Röhrchen nicht abwischen und beim Entfernen der Röhrchen nicht gegen die Seite des Ständers stoßen. Das Röhrchen mit einer glatten Bewegung um 180° kippen. Den Vorgang nicht auf halbem Weg abbrechen, es sei denn, es ist offensichtlich, daß sich kein Gel gebildet hat. Ein positiver Test wird durch die Bildung des Gels angezeigt, das beim Umdrehen des Röhrchens nicht in sich zusammenfällt.

Ergebnisse und Interpretation

Beispiel der Standard-Verdünnungsreihe

Die Empfindlichkeit von Pyrotell bestätigen und das Labor bzw. den Techniker qualifizieren, indem ein LAL-Test an einer Reihe bekannter Standard-Endotoxin-Konzentrationen (1, 2) durchgeführt wird, die in die gekennzeichnete Empfindlichkeitsspanne fallen (z.B., 2λ, λ, 0.5λ und 0.25λ). Im folgenden Beispiel beträgt die Empfindlichkeit von Pyrotell (λ) 0,25 EU/mL:

Endotoxin-Konzentration	*Testergebnis*
0.5 EU/mL (2λ)	+
0.25 EU/mL (λ)	+
0.125 EU/mL 0.5λ)	–
0.06 EU/mL (0.25λ)	–
LRW (Negativkontrolle)	–

Der Endpunkt dieser Analyse ist als die niedrigste Konzentration von Endotoxin definiert, die einen positiven Test ergibt. Die gekennzeichnete Empfindlichkeit des Pyrotells wird bestätigt, wenn der Endpunkt plus oder minus eine zweifachen Verdünnung beträgt. In diesem Beispiel ist die Konzentration des Endotoxins im letzten positiven Röhrchen in der Serie 0,25 EU/mL oder

λ; dadurch ist die Empfindlichkeit bestätigt. Der Test wäre gültig (die Empfindlichkeit bestätigt), wenn der Endpunkt zwischen 0,125 und 0,5 EU/mL (der Fehler der Methode) läge. Um einen Endpunkt von 0,125 EU/mL anzuzeigen, muß der Gehalt 0,06 EU/mL in der Serie vorhanden und negativ sein.

Bei Mehrfachbestimmungen wird die Empfindlichkeit als geometrischer Mittelwert (GM) der einzelnen Empfindlichkeiten ausgedrückt:

$$GM = \text{Antilog}\ [(\Sigma e)/f]$$

wobei Σe = Summe der Log-Endpunkte und f = Anzahl der Endpunkte bei Mehrfach bestimmungen ist.

Die LRW-**Negativkontrolle** sollte einen negativen Test ergeben. Wenn die Negativkontrolle gerinnt, sind LRW, Glasbehälter oder Pyrotell kontaminiert. Die Mischung sollte klar sein und keine erhöhte Viskosität zeigen. „Schneeflocken" oder Ausflockung zeigen eine Endotoxin-Konzentration an, die geringer als die Pyrotell-Empfindlichkeit ist.

Ist keine Endotoxin-Reihe vorhanden (1), kann eine **Positivkontrolle** mitgeführt werden. Die Positivkontrolle mit 2λ entspricht dem Gehalt von 0,5 EU/mL im oben angeführten Beispiel. Fällt die Positivkontrolle negativ aus, ist die Pyrotell-Empfindlichkeit geringer als die doppelte gekennzeichnete Empfindlichkeit, und der Test der Probe ist ungültig. Ein Verlust der Empfindlichkeit kann darauf hindeuten, daß das Pyrotell zerfallen ist, das Endotoxin an Aktivität verloren hat (oft aufgrund von Adsorption an die Behälteroberfläche) oder der Test nicht ordnungsgemäß durchgeführt wurde.

Beispiel eines Grenzwert-Tests (Pass/Fail - Bestanden/Nicht bestanden)

Es ist möglich, die Konzentration einer Probe durch die gegebene Empfindlichkeit von Pyrotell zu bestimmen, wobei das Ergebnis anzeigt, ob die Test-Probe mehr oder weniger Endotoxin enthält als ihr Grenzwert angibt. In diesem Beispiel beträgt die Konzentration der Probe 1 mg/mL und der gewünschte bzw. vorherbestimmte Endotoxin-Grenzwert für die Probe beträgt 3 EU/mg (siehe Abschnitt „Beschränkungen des Verfahrens"). Der Grenzwert, in EU/mL ausgedrückt,

$$(3\ EU/mg)\ (1\ mg/mL) = 3\ EU/mL$$

ist höher als die Empfindlichkeit von Pyrotell, 0,25 EU/mL, weshalb die Probe verdünnt werden muß, damit ein Pass/Fail-Test durchgeführt werden kann. Die Verdünnung der Probe bestimmen, die ein „Bestanden" (< 3 EU/mL) oder „Nicht bestanden" (≥3 EU/mL) des Tests anzeigt, indem der Endotoxin-Grenzwert in EU/mL durch die Empfindlichkeit des LAL dividiert wird:

$$3\ EU/mL : 0,25\ EU/mL = 12.$$

Ein Teil Probe mit 11 Teilen LRW mischen, um eine Verdünnung von 1:12 zu erhalten, und den Test durchführen. Das Ergebnis zeigt an, ob die Probe den Test bei einem Grenzwert von 3 EU/mL besteht. Positive Produktkontrollen läßt man mit derselben Verdünnung wie die Probe mitlaufen, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Beispiel einer Probenanalyse

Endotoxin wird bei einer Analyse quantifiziert, indem der Endpunkt in einer Serie von Probenverdünnungen bestimmt wird. Im folgenden Beispiel ist die Probe mit LRW verdünnt, und die Verdünnungen in der Tabelle werden getestet; λ ist 0,25 EU/mL. Die Ergebnisse werden als positiv oder negativ verzeichnet.

Verdünnung der Untersuchungsprobe	*Testergebnis*
unverdünnt	+
1 : 2	+
1 : 4	+
1 : 8	–
1 : 16	–
1 : 32	–
Negativkontrolle	–

Um die Konzentration des Endotoxins in der Probe zu berechnen, die Pyrotell-Empfindlichkeit (λ) durch den Kehrwert der Verdünnung am Endpunkt dividieren:

$$\text{Konz.} = (\lambda)\ (4/1) = (0,25\ EU/mL)\ (4) = 1\ EU/mL$$

Die Konzentration der Mehrfachbestimmungen wird als geometrischer Mittelwert ausgedrückt.

Eine **positive Produktkontrolle** (Untersuchungsprobe mit 2λ Standard-Endotoxin versetzt) muß vorhanden sein und positiv ausfallen, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Wenn die positive Produktkontrolle negativ und die Positivkontrolle positiv ist, stört (hemmt) die Probe den LAL-Test. Die Probe sollte mit einer höheren Verdünnung erneut getestet werden (die MZV nicht überschreiten; siehe Abschnitt „Beschränkungen des Verfahrens").

Beschränkungen des Verfahrens

Das Verfahren wird durch die Fähigkeit von Proben beschränkt, den LAL-Test zu hemmen oder zu verstärken. Wenn das Verfahren bei einer Probenkonzentration (MVD) oberhalb der minimal zulässigen Konzentration (MZK) nicht validiert werden kann (1, 2), kann der LAL-Test nicht als Ersatz für den USP-Pyrogentest dienen. Die MZK wird folgendermaßen berechnet:

$$MZK = \frac{(\lambda)\ (\text{Dosis pro kg Körpergewicht})}{\text{Endotoxin-Toleranzgrenze}}$$

wobei λ in EU/mL, die Dosis in Einheiten pro kg Körpergewicht und die Endotoxin-Toleranzgrenze in EU/kg angegeben werden.

Die maximal zulässige Verdünnung (MZV) ist die Verdünnung der Probe, die die MZK (1) enthält. Dies ist die Ausgangskonzentration der Probe, dividiert durch die MZK.

Die Endotoxin-Toleranzgrenze (1) beträgt 0,2 EU/kg für Arzneimittel, die intrathekal verabreicht werden, und 5 EU/kg für alle anderen Parenteralia. Der Grenzwert für Medizinprodukte wird pro mL Extraktionsflüssigkeit oder Spülvolumen ausgedrückt, wie in der FDA-Richtlinie beschrieben (1). Bei Medizinprodukten, die mit Liquor cerebrospinalis in Kontakt kommen, beträgt der Grenzwert 0,06 EU/mL; für alle anderen Produkte beträgt der Grenzwert 0,5 EU/mL. Der Grenzwert für flüssige Medizinprodukte ist identisch mit dem für Arzneimittel.

Trypsin verursacht falsch-positive Ergebnisse, es sei denn, es wird vor dem Test durch Hitzebehandlung denaturiert. Stoffe wie Blut, Serum und Plasma sollten vor dem Test behandelt werden, damit Inhibitoren inaktiviert werden (12).

Zu erwartende Werte

Endotoxin kann quantifiziert werden, wenn die Konzentration höher als oder gleich der Pyrotell-Empfindlichkeit ist. Aus biologischen Quellen gewonnene Stoffe können meßbare Endotoxinmengen enthalten, sogar nach einer biochemischen Reinigung. Wasser, das mit Hilfe von Destillation, Umkehrosmose oder Ultrafiltration gewonnen wurde, enthält u. U. weniger Endotoxin als festgestellt werden kann, solange der Reinigungsvorgang ordnungsgemäß durchgeführt und das Wasser nicht nach der Herstellung kontaminiert wird.

Charakteristika der Methode

Die Fehlerbreite der Festgel-Methode beträgt plus oder minus einer zweifachen Verdünnung am Endpunkt der Analyse.

Bibliographie

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, USP 26 NF 21. 2003.
3. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of Limulus polyphemus, Callinectes hastatus, and Cucumaria sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
4. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
5. Levin, J., und F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
6. Levin, J., und F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
7. Levin, J., und F. B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
8. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
9. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, und T. J. Novitsky (Hrsg.), Alan R. Liss, Inc., NY.
10. Tsuji, K. und S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
11. Sweet, B. H. und J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

Unsere erfahrenen Mitarbeiter besprechen gerne mit Ihnen die praktischen und theoretischen Aspekte des LAL-Tests. Bitte rufen Sie an, wenn bei der Benutzung von Pyrotell Schwierigkeiten auftreten. Wir leisten Ersatz für alle Produkte, die nicht den Produktspezifikationen entsprechen. Vor der Rücksendung des Produkts müssen wir jedoch informiert werden.

Italiano

LISATO DI AMEBOCITI DI *LIMULUS*

PYROTELL®

Fiala multitest
per il rilevamento e la quantificazione di endotossine
batteriche Gram-negative (lipopolisaccaridi)

Il saggio del lisato di amebociti di *Limulus* (LAL), qualora utilizzato in conformità con le direttive (1) della Food and Drug Administration (FDA) statunitense, può sostituire il saggio dei pirogeni (test della febbre dei conigli), riconosciuto dalla Farmacopea Statunitense (USP), per testare prodotti finiti quali i "farmaci iniettabili nell'uomo (inclusi i prodotti biologici), farmaci iniettabili negli animali e presidi medici". Il LAL test viene raccomandato per quantificare la presenza di endotossine nelle materie prime utilizzate in produzione, inclusa l'acqua, e per monitorare i livelli delle endotossine in processo. L'esame delle endotossine batteriche (2) della Farmacopea Statunitense (USP Bacterial Endotoxins Test) è il test ufficiale di riferimento nelle monografie specifiche della Farmacopea Statunitense.

Riassunto del test

Il lisato di amebociti di *Limulus* è un estratto acquoso proveniente dalle cellule sanguigne (amebociti) del "granchio a ferro di cavallo", *Limulus polyphemus*. Il LAL test viene eseguito aggiungendo 0,1 mL di Pyrotell ricostituito a 0,1 mL di campione da esaminare all'interno di una provetta da saggio in vetro "flint" (soda calcica) da 10 x 75 mm, depirogenata. La soluzione reagente viene mescolata bene epoi posta immediatamente in un incubatore a secco, oppure in un bagnomaria ad acqua non circolante ad una temperatura di 37 ± 1°C per 60 ± 2 minuti. Al termine del periodo di incubazione la provetta viene rimossa dall'incubatore e capovolta di 180°. Se sul fondo della provetta da saggio si forma del gel che rimane intatto dopo l'inversione di 180°, il test risulta essere positivo, quindi la concentrazione di endotossina presente nella provetta è maggiore o uguale alla sensibilità del Pyrotell. Se la miscela reagente appare in qualsiasi altro stato significa che il test è negativo e la concentrazione di endotossina è minore della sensibilità del Pyrotell. Anche quando il gel si forma, ma si rompe o crolla durante l'inversione, il test risulta essere negativo. Il LAL test è rapido, specifico, facile da eseguire ed altamente sensibile. Utilizzando la tecnica di gelificazione, il Pyrotell può rilevare unità endotossiniche (Endotoxin Units o EU) in quantità piccole fino a 0,03/mL.

Storia e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1885 (3). Negli anni cinquanta, presso il laboratorio biologico marino di Woods Hole, nel Massachusetts, Bang scoprì che i batteri Gram - negativi provocavano la coagulazione del sangue di *Limulus* (4). Levin e Bang determinarono in seguito che la reazione è di tipo enzimatico e che gli enzimi sono situati nei granuli degli amebociti (5). Dimostrarono che la coagulazione viene iniziata da un componente strutturale unico, presente nella parete della cellula batterica: l'endotossina o lipopolisaccaride (6). Oggi si ritiene che la formazione della coagulazione sia il risultato di innumerevoli passaggi di attivazione degli enzimi. Nonostante si sia all'oscuro dell'intero ciclo della reazione, si è tuttavia in grado di descrivere minuziosamente l'ultimo passaggio. La proteina coagulante (coagulogeno) viene scissa dall'enzima coagulante attivato ed i prodotti insolubili della scissione si uniscono mediante una interazione ionica, andando a formare la matrice del gel. Ulteriori informazioni sul LAL test e sulle relative applicazioni sono disponibili in letteratura (7,8,9).

Reagente

Il lisato di amebociti di *Limulus* (LAL) Pyrotell viene confezionato in forma liofilizzata all'interno di fiale da 2 o 5 mL. Il Pyrotell contiene solamente un estratto acquoso di amebociti di *L. polyphemus*, 1,5 % v/v di albumina sierica umana al 25 % (stabilizzante), 3 % di NaCl ed altri ioni adeguati. Non sono stati aggiunti conservanti, tamponi od altri ingredienti.

La casa produttrice Associates of Cape Cod, Inc. offre lotti individuali del Pyrotell con sensibilità comprese fra 0,03 e 0,5 EU/mL, in conformità alla USP Endotoxin Reference Standard (Endotossina Standard di Riferimento della Farmacopea Statunitense), nota anche come Reference Standard Endotoxin o RSE. La sensibilità λ, è dunque la concentrazione minima di RSE in grado di coagulare in modo compatto il gel in presenza di condizioni standard. La sensibilità del lotto, misurata in EU/mL, viene stampata sulle etichette della fiala e della confezione. Si prega di specificare la sensibilità desiderata al momento dell'ordinazione.

Utilizzare il Pyrotell solamente per eseguire esami diagnostici in vitro. Non utilizzare questo prodotto per rilevare l'endotossemia. La tossicità di questo reagente non è stata ancora determinata, perciò occorre prestare attenzione quando si maneggia il Pyrotell.

Ricostituzione del Pyrotell

1. Dare un colpetto leggero alla fiala del Pyrotell di modo che il reagente LAL scenda sul fondo della fiala. Togliere la ghiera di alluminio ed eliminare il vuoto alzando leggermente il tappo grigio. Non contaminare l'imboccatura della fiala nè perforare il tappo o riutilizzare quest'ultimo. Una piccola quantità del LAL rimasta sul tappo non influirà sul test. Coprire la fiala con il parafilm "M"® (fabbricato dalla American National Can™) quando non viene usata.
2. Ricostituire il Pyrotell con acqua per LAL ((LAL Reagent Water o LWR, vedi sotto) o con il tampone compatibile (disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc.). Aggiungere 2,0 ; o 5,0 mL come indicato sull'etichetta della fiala. Il contenuto si dissolverà in pochi minuti. Prima dell'uso, mescolare con delicatezza il contenuto della fiala per garantire una certa omogeneità.

Condizioni necessarie per la conservazione

Il Pyrotell liofilizzato è relativamente stabile rispetto al calore e, se refrigerato, presenterà una reagibilità elevata fino alla data di scadenza presente sull'etichetta della fiala. Appena ricevuto il prodotto, conservarlo ad una temperatura compresa fra - 20 e + 8°C. Le temperature inferiori ai - 20°C riducono le dimensioni del tappo, provocando una perdita del vuoto e l'eventuale contaminazione del Pyrotell. Al contrario, temperature superiori a 37°C possono deteriorare rapidamente il Pyrotell liofilizzato, comportando una perdita della sensibilità ed un'evidente colorazione giallastra del prodotto. Il Pyrotell viene spedito con mattonelle refrigerate all'interno di contenitori isolati, in grado di proteggere i prodotti da temperature eccessive.

Il Pyrotell ricostituito è in genere trasparente e leggermente opalescente. A volte certi lotti possono presentare una piccola ed uniforme torbidità. La presenza di piccole fibre o filamenti non sta ad indicare l'eventuale contaminazione nè influisce sull'attività; tuttavia, una precipitazione flocculante oppure un netto colore giallo rappresentano una manifestazione del processo di deterioramento.

Il Pyrotell ricostituito è meno stabile del prodotto liofilizzato; le fiale possono essere conservate per 24 ore ad una temperatura compresa fra 2 e 8°C. Il Pyrotell ricostituito può essere congelato una volta sola. Il prodotto sarà pienamente attivo per tre mesi se congelato immediatamente dopo la ricostituzione e tenuto ad una temperatura uguale o inferiore a - 20°C. Una volta scongelato il prodotto, se ne determina la qualità utilizzando gli stessi criteri visivi che vengono applicati per la ricostituzione iniziale.

Raccolta e preparazione dei campioni

I campioni devono essere raccolti in modo asettico all'interno di contenitori apirogeni. Si raccomanda di utilizzare articoli di vetro già riutilizzati e depirogenati, o di polistirene sterile monouso, per minimizzare l'assorbimento di endotossina sulle superfici del contenitore. Non tutti i contenitori di plastica sono privi di endotossina percettibile ed alcune sostanze estraibili da alcuni tipi di materia plastica potrebbero interferire con il LAL test. I contenitori (selezionati in modo randomizzato all'interno di un lotto) possono essere risciacquati con piccole quantità di LWR (acqua per LAL) (a temperatura ambiente per la durata di un'ora), dopo di che la soluzione di risciacquo, fungendo da campione da esaminare, viene analizzata per determinare se il lotto è accettabile o meno.

Il pH della miscela reagente (che consiste nel campione aggiunto al Pyrotell) deve essere di 6 - 8. Regolare il pH del campione aggiungendo HCl o NaOH (privo di endotossina percettibile) o tampone compatibile (veda 3 qui sotto). Diluire il componente chimico HCl o NaOH con LWR fino a raggiungere un livello accettabile che non comporti una diluizione considerevole del campione in esame una volta che è stato regolato. Non alterare il pH della soluzione salina priva di tampone o dell'acqua.

Sostanze che denaturano le proteine, rendono i cationi chelati, legano l'endotossina oppure alterano lo stato idrorepellente dell'endotossina, possono interferire con il risultato del test. E' possibile individuare una interferenza se si recupera una quantità considerevolmente maggiore o inferiore di endotossina rispetto a quella prevista, quando viene aggiunta al campione una quantità nota di endotossina standard (vedere la sezione "Limiti della procedura"). Nella maggior parte dei casi la diluizione del campione ridurrà la concentrazione e l'attività delle sostanze che interferiscono, garantendo tuttavia risultati validi del test. Controlli adeguati ed un metodo di diluizione vengono discussi nella sezione "Protocollo operativo".

I campioni raccolti devono essere sottoposti quanto prima all'esame. Si consiglia di congelare i campioni non sterili che vengono immagazzinati o spediti prima dell'esame. Esaminare i campioni che si ritiene contengano una bassa concentrazione di endotossina (inferiore a 1 EU/mL) ai fini di individuare una perdita di endotossina durante la conservazione.

Protocollo operativo

Reagenti del test

1. *Fiala multitest Pyrotell* (leggere la descrizione ed il metodo di ricostituzione descritto nella sezione sopra indicata).
2. *LWR* (acqua per LAL), da ordinare separatamente in quanto non viene fornita con il Pyrotell. Il Pyrotell deve essere ricostituito utilizzando dell'acqua che non presenti endotossine percettibili al LAL test. Si raccomanda l'uso di acqua sterile prodotta da Associates of Cape Cod, Inc. oppure l'acqua sterile per iniezione o per irrigazione (Sterile Water for Injection or Irrigation o WFI) approvata dalla Farmacopea Statunitense, la quale è priva di batteriostatici. Il limite di endotossina nella WFI della Farmacopea Statunitense è di 0,25 EU/mL, perciò la WFI potrebbe presentare endotossine percettibili qualora testata con un Pyrotell maggiormente sensibile. Per determinare se un nuovo lotto di acqua presenti le stesse caratteristiche del LRW, occorre ricostituire il Pyrotell ed effettuare diluizioni dell'endotossina standard con il nuovo lotto di acqua, al fine di confermare la sensibilità del Pyrotell. Una volta che la sensibilità del lotto in esame viene confermata ed il controllo negativo indica la mancanza di aumento della viscosità e della precipitazione flocculante, l'acqua è pronta per l'uso. Utilizzare LWR sia per ricostituire il Pyrotell e le endotossine standard, che per diluire le endotossine standard ed i campioni da esaminare.
3. *Tampone*, da ordinare separatamente in quanto non viene fornito con il Pyrotell. Il tampone Pyrosol (Cat# BR051 o BC554) o tampone Glucashield™ (Cat# GB051) può sostituire l'acqua reagente per LAL per ricostituire il Pyrotell ed aiutare a superare problemi di pH nel campione oppure un interferenza dai glucani.
4. *Endotossina standard* (Standard Endotoxin), da ordinare separatamente in quanto non viene fornita con il Pyrotell. L'endotossina standard di controllo (Control Standard Endotoxin o CSE), prodotta da Associates of Cape Cod, Inc viene usata per confermare la sensibilità del Pyrotell, convalidare il prodotto e preparare i controlli di inibizione. Ogni fiala contiene un peso misurato di endotossina. L'endotossina standard di riferimento (Endotoxin Reference Standard) della Farmacopea Statunitense può essere ottenuta presso la U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Seguire le istruzioni del fabbricante per eseguire la ricostituzione e conservare le endotossine standard. I lotti di CSE possono presentare diverse attività (EU/ng) quando provate con diversi lotti di Pyrotell. Richiedere un certificato di analisi che confermi l'attività della CSE abbinata ad un lotto specifico di Pyrotell.

Materiali ed apparecchiature (non inclusi)

1. *Provette da saggio*, 10 x 75 mm, in vetro "flint" (Cat# TS050) (soda calcica), apirogene. Alcune marche sono caratterizzate da proprietà inibitorie qualora abbinate ad alcuni lotti di Pyrotell. Le provette apirogene sono preparate da Associates of Cape Cod, Inc.
2. *Bagnomaria ad acqua non circolante*, oppure incubatore a secco (Cat# TH120), in grado di mantenere una temperatura di 37 ± 1°C.
3. *Supporti in grado di sostenere* e/o incubare le provette da saggio.
4. *Pipette*, micropipette con puntali, oppure pipettatore automatico a ripetizione per siringhe. Si raccomanda l'uso di prodotti sterili monouso.
5. *Agitatore vortex*.
6. *Parafilm "M"*.® Normalmente il lato a contatto con lo strato di carta è apirogeno.
7. *Provette da saggio apirogene*, di capacità adeguata per consentire di effettuare le diluizioni dell'endotossina standard o dei campioni da esaminare (le provette di vetro da 18 x 150 mm con chiusura in acciaio inossidabile Morton sono riutilizzabili e convenienti). Vedere la sezione "Raccolta e preparazione dei campioni" per avere informazioni su altri contenitori adatti per le diluizioni.
8. *Stufe ad aria calda* da 250°C per la depirogenazione degli articoli di vetro. Nell'uso comune, le minime impostazioni di tempo e temperatura sono 30 minuti a 250°C (2, 11).

Controlli

I controlli sono necessari al fine di accertare la validità di un esame. Le procedure consigliate sono elencate in modo dettagliato dalla FDA (1) e nella Farmacopea Statunitense (2).

1. **Controlli di endotossina**
   a. **Serie standard di endotossina**. Preparare quotidianamente una serie fresca di diluizioni dalla soluzione di endotossina ricostituita e conservata in frigorifero. Preparare una serie di diluizioni al raddopppio in modo tale che includa la sensibilità (λ) del Pyrotell. Le concentrazioni di 2λ, λ, 0.5λ e 0.25λ sono raccomandate per confermare la sensibilità del Pyrotell. Effettuare un numero ridotto di diluizioni dispensando volumi appropriati con pipette graduate al fine di raggiungere la massima precisione.
   b. In alcuni casi i **controlli positivi** possono essere utilizzati in assenza di una serie di concentrazioni standard. Per ulteriori informazioni fare riferimento alle direttive della FDA (1) presenti nell'articolo "Routine Testing of Drugs by the LAL Test" [Esami di routine dei farmaci mediante LAL test]. Le concentrazioni del controllo positivo devono essere di 2λ.
   c. **I controlli positivi del prodotto** sono controlli di inibizione e sono costituiti dal campione o dalla diluizione del campione, al quale viene aggiunta l'endotossina standard. La concentrazione dell'endotossina aggiunta al campione deve essere 2λ.
2. **Controlli negativi**
   Il controllo o i controlli negativi (acqua per LAL = LWR) devono essere inclusi nel test assieme a ciascun lotto di campione da testare. Durante la convalida del prodotto o in occasione del test di inibizione/attivazione (1,2) anche il campione usato per diluire l'endotossina standard viene trattato come un controllo negativo.

Preparazione del campione per il saggio limite o per il test.

Diluire il campione alle concentrazioni richieste per effettuare l'esame del saggio limite (accettato/respinto) o per eseguire un test esaminando una serie di concentrazioni (esempi dei due tipi di esami sono inclusi nella sezione "Risultati ed interpretazione"). Si possono preparare le diluizioni dei campioni nelle apposite provette ed in seguito trasferire il volume di miscela da esaminare nelle provette da saggio, altrimenti, le diluizioni possono essere eseguite direttamente nelle provette da saggio lasciando in ciascuna un volume di 0,1 mL da esaminare. La diluizione testata nel saggio limite viene determinata attraverso la sensibilità del Pyrotell ed il limite endotossinico del campione. Fare riferimento alla sezione "Limiti della procedura" oppure alle direttive della FDA (1) per ottenere spiegazioni e disporre di un calcolo della minima concentrazione valida (Minimum Valid Concentration o MVC) e della massima diluizione valida (Maximum Valid Dilution o MVD).

Esecuzione del test

Per ottenere dei risultati soddisfacenti occorre adottare una **tecnica adeguata**.

1. Aggiungere 0,1 mL di Pyrotell ricostituito in ogni provetta da saggio contenente 0,1 mL di campione o di controllo. Utilizzare una pipetta graduata (con incrementi da 0,1 mL) oppure un pipettatore automatico oppure a ripetizione. Inizialmente, aggiungere il Pyrotell ai controlli negativi passando poi dalle concentrazioni più basse a quelle più alte in ciascuna serie di esami in cui i residui potrebbero rappresentare un problema. Si raccomanda l'uso di una pipetta o puntale nuovi per prelevare ogni volta dalla fiala Pyrotell. Agitare vigorosamente il supporto che contiene le provette per una durata di 20-30 secondi per garantire un adeguato mescolamento. Se sono presenti solo poche provette, allora ciascuna di esse può essere agitata su vortex per 1-2 secondi. Una agitazione inadeguata è generalmente la causa più comune di risultati insoddisfacenti.
2. Incubare le provette da saggio a 37 ± 1°C in bagnomaria o in termostato a secco per 60 ± 2 minuti. La reazione inizia quando il componente LAL viene aggiunto al campione in esame, tuttavia non avviene in modo ottimale finchè la miscela non raggiunge i 37°C. Se si esaminano molti campioni in parallelo, gli esami devono essere raggruppati in lotti ed iniziati ad intervalli tali da permettere la lettura di ciascuno entro un certo limite di tempo.
   Non disturbare le provette da saggio durante il periodo di incubazione. La reazione che consente la formazione del gel è delicata e potrebbe venire interrotta se le provette venissero maneggiate, agitate o subissero vibrazioni. Non usare bagnimaria con agitazione dell'acqua o altre sorgenti di vibrazione. Immergere le provette fino a superare il livello della miscela reagente, ma non inserirle troppo in profondità onde evitare di causarne il galleggiamento o lo spostamento all'interno del supporto.
3. Togliere, ad una ad una, le provette da saggio, leggendone i risultati individualmente. Non asciugare le provette mediante strofinamento, nè scontrarle contro il lato del supporto durante la rimozione. Invertire la provetta con un movimento uniforme; non fermarsi a metà via durante l'inversione, a meno che non sia ovvio che il gel non si sia formato. Il risultato positivo dell'esame viene indicato dalla formazione di un gel che non collassa quando la provetta viene invertita.

Risultati ed interpretazione

Esempio di una serie di concentrazioni standard dell'endotossina

Confermare la sensibilità del Pyrotell e qualificare il laboratorio oppure il tecnico eseguendo l'esame LAL su una serie conosciuta di concentrazioni di endotossina standard (1,2) che includa la sensibilità indicata sull'etichetta (ad esempio : 2λ, λ, 0.5λ, 0.25λ). Per questo esempio la sensibilità (λ) del Pyrotell è di 0.25 EU/mL :

Concentrazione di endotossina	*Risultato della prova*
0.5 EU/mL (2λ)	+
0.25 EU/mL (λ)	+
0.125 EU/mL 0.5λ)	–
0.06 EU/mL (0.25λ)	–
LRW (controllo negativo)	–

L'endpoint di questa prova viene definito dalla concentrazione minore di endotossina necessaria per ottenere un risultato positivo. La sensibilità indicata sull'etichetta del Pyrotell viene confermata se l'endpoint è λ più o meno una diluizione al raddoppio. In questo esempio la concentrazione di endotossina nell'ultima provetta con risultato positivo nella serie è di 0,25 EU/mL o λ, perciò la sensibilità viene confermata. L'esame sarebbe valido (la sensibilità verrebbe dunque confermata) se l'endpoint fosse da 0,125 a 0,500 EU/mL (errore del metodo). Per mostrare un endpoint di 0,125 EU/mL, la concentrazione 0,06 EU/mL deve essere presente nella serie degli standards e risultare negativa al test.

Quando la prova dell'endotossina viene replicata, la sensibilità viene espressa come media geometrica (GM) delle sensibilità individuali:

$$GM = \text{antilogaritmo}\ [(\Sigma e)/f]$$

dove Σe = somma dei logaritmi degli endpoints ed f = numero degli endpoints replicati.

Il **controllo negativo** LRW (acqua per LAL) deve dare un risultato negativo al LAL test. Se il controllo negativo coagula, significa che LRW, gli articoli di vetro o il Pyrotell sono contaminati. La miscela deve essere trasparente senza presentare aumenti di viscosità. Particelle o precipitazioni flocculanti indicano che la concentrazione dell'endotossina è inferiore alla sensibilità del Pyrotell.

In mancanza della serie di concentrazioni dell'endotossina (1) si può includere nel test un controllo positivo. Il **controllo positivo** a 2λ è la concentrazione endotossinica di 0.5 EU/mL nell'esempio suddetto. Se il controllo positivo dà risultato negativo, la sensibilità del Pyrotell è inferiore al valore doppio della sensibilità etichettata e l'esame del campione risulta invalidato. La perdita della sensibilità potrebbe significare che il Pyrotell è deteriorato, l'endotossina ha perduto la potenza (spesso a causa dell'assorbimento sulla superficie del contenitore) oppure l'esame non è stato condotto in modo adeguato.

Esempio di un saggio limite (accettato/respinto)

E' possibile esaminare una concentrazione del campione con un Pyrotell a sensibilità dichiarata ed ottenere dei risultati in grado di determinare se il campione in esame presenta o meno una quantità superiore o inferiore di endotossina rispetto al suo limite. In questo esempio la concentrazione del campione è di 1 mg/mL ed il suo limite predeterminato o desiderato di endotossina è di 3 EU/mg (vedere la sezione "Limiti della procedura"). Il limite espresso in EU/mL,

$$(3\ EU/mg)\ (1\ mg/mL) = 3\ EU/mL$$

è maggiore della sensibilità del Pyrotell, 0,25 EU/mL; di conseguenza il campione deve essere diluito al fine di poter essere sottoposto al saggio limite. Stabilire la diluizione del campione che indicherà il buon esito del test (accettato), ossia < 3 EU/mL, oppure l'esito negativo (respinto), ≥ 3 EU/mL, dividendo il limite dell'endotossina misurato in EU/mL per la sensibilità del LAL:

$$3\ EU/mL\ /\ 0,25\ EU/mL = 12$$

Miscelare una parte di campione con 11 parti di LRW allo scopo di raggiungere una diluizione 1 : 12 e su questa effettuare il test. Il risultato indicherà se il campione passa l'esame al limite di 3 EU/mL. I controlli positivi del prodotto sono inclusi nel test, assieme alla diluizione del campione al fine di eliminare i risultati falsi negativi.

Esempio di un'analisi effettuata su un campione

L'endotossina viene quantificata in una prova trovando l'endpoint in una serie di diluizioni del campione. Nell'esempio indicato di seguito, il campione viene diluito con LRW (acqua per LAL) e le diluizioni indicate nella tabella vengono testate: λ è il valore 0,25 EU/mL. I risultati vengono indicati con il simbolo positivo positivo o negativo.

Diluizione del campione	*Risultato del test*
non diluito (tal quale)	+
1 : 2	+
1 : 4	+
1 : 8	–
1 : 16	–
1 : 32	–
controllo negativo	–

Per calcolare la concentrazione di endotossina nel campione, moltiplicare la sensibilità del Pyrotell (λ) per il reciproco della diluizione all'endpoint :

$$\text{Conc.} = (\lambda)\ (4/1) = (0,25\ EU/mL)\ (4) = 1\ EU/mL$$

La concentrazione per le prove replicate viene espressa con una media geometrica.

Occorre preparare un **controllo positivo del prodotto** (campione miscelato con endotossina standard 2λ) che risulti positivo al LAL test per eliminare i risultati falsi negativi. Se il controllo positivo del prodotto risulta negativo ed il controllo positivo del test risulta positivo, il campione interferisce con il LAL test (inibizione). Il campione deve essere riesaminato ad una diluizione maggiore, che non superi il valore della Massima diluizione valida (MVD); vedere la sezione "Limiti della procedura".

Limiti della procedura

La procedura viene limitata dalla capacità del campione di inibire o attivare la reazione del LAL. Se la procedura non può essere convalidata (1, 2), ad una concentrazione del campione superiore alla Minima concentrazione valida (MVC), allora l'esame LAL non può sostituire l'esame dei pirogeni per la Farmacopea Statunitense. La MVC viene calcolata nel modo seguente:

$$MVC = \frac{(\lambda)\ (\text{dose di campione})}{\text{limite di tolleranza endotossinica}}$$

dove λ è calcolata in EU/mL, la dose del campione in unità per Kg peso corporeo e il limite di tolleranza endotossinica in EU/Kg.

La Massima diluizione valida (MVD) è la diluizione del campione contenente la Minima concentrazione valida (1). E' la concentrazione iniziale del campione divisa per la MVC.

Il limite di tolleranza endotossinica (1) è di 0,2 EU/Kg per i farmaci somministrati per via intratecale e di 5 EU/Kg per tutti quelli che sono somministrati per via parenterale. Il limite per i presidi medici viene espresso in "mL" di liquido di estrazione o liquido di risciacquo ottenuto come descritto nella direttiva FDA (1). Per i presidi che vanno a contatto con il liquido cerebrospinale, il limite è di 0,06 EU/mL ; per quelli che non vanno a contatto è di 0,5 EU/mL. Il limite per i dispositivi dei liquidi è identico a quello dei farmaci.

La tripsina causerà risultati falsi positivi a meno che non sia denaturata mediante trattamento a caldo prima di effettuare il test. Materiali quali sangue, siero e plasma, devono essere trattati al fine di inattivare gli inibitori prima di effettuare il test.

Valori medi

L'endotossina può essere quantificata se la concentrazione è maggiore o uguale alla sensibilità del Pyrotell. I materiali che provengono da sorgenti biologiche, anche dopo essere state sottoposte a purificazione biochimica, potrebbero contenere livelli misurabili di endotossina. L'acqua ottenuta mediante distillazione, osmosi inversa oppure ultra-filtrazione, potrebbero contenere quantità minori di endotossina di quella percettibile finché il processo di purificazione funziona in modo corretto e l'acqua non viene contaminata dopo la produzione.

Caratteristiche specifiche di prestazione

L'errore insito nel metodo di gelificazione è di più o meno una diluizione al raddoppio dell'endpoint del saggio.

Bibliografia

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, Current USP.
3. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of Limulus polyphemus, Callinectes hastatus, and Cucumaria sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
4. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
5. Levin, J., e F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
6. Levin, J., e F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
7. Levin, J., e F. B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
8. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
9. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, e T. J. Novitsky (editori), Alan R. Liss, Inc., NY.
10. Tsuji, K. e S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
11. Sweet, B. H. e J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

Il nostro personale qualificato è disponibile a discutere gli aspetti pratici e teorici del LAL Test. Si prega di contattare la Casa produttrice nel caso sorgessero inconvenienti con l'uso del Pyrotell. I prodotti che non reagiscono come indicato nelle specifiche tecniche verranno sostituiti, tuttavia l'azienda deve essere avvisata prima di effettuare la restituzione dei prodotti ritenuti difettosi.

Español

LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS*

PYROTELL®

Vial de Pruebas Múltiples
para la Detección y Cuantificación de Endotoxinas
de Bacterias Gram Negativas (Lipopolisacáridos)

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), cuando es utilizada de acuerdo a las directivas de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, Food and Drug Administration) de los Estados Unidos (1), puede reemplazar la prueba de pirógenos (prueba de fiebre de conejos) de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, U.S. Pharmacopeia), para el control de producto terminado de "drogas inyectables para uso humano (incluyendo productos biológicos), drogas inyectables para uso animal, y dispositivos médicos." Se recomienda la prueba LAL para la cuantificación de endotoxinas en materia prima empleada en producción, incluyendo agua, y para controlar los niveles de endotoxinas durante el proceso de producción. La prueba oficial a la que se hace referencia en monografías específicas de la USP es la Prueba de Endotoxinas Bacterianas de la USP (USP Bacterial Endotoxins Test) (2).

Resumen de la Prueba

El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de las células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura, el *Limulus polyphemus*. La prueba del LAL se realiza agregando 0,1 mL de Pyrotell reconstituido a 0,1 mL de la muestra a ensayar en un tubo de reacción despirogenizado de vidrio "flint" (cal sódica) de 10 x 75 mm. Se mezcla bien la solución de la reacción y se coloca inmediatamente en una incubadora de bloque seco o en un baño de agua sin circulación a 37 ± 1°C durante 60 ± 2 minutos. Al final del período de incubación, se remueve el tubo de la incubadora y se invierte. Si se ha formado un coágulo y éste permanece íntegro en el fondo del tubo de reacción después de invertirlo 180°, la prueba es positiva, esto es, la concentración de endotoxina en el tubo de reacción es mayor o igual a la sensibilidad del Pyrotell. Cualquier otro estado de la mezcla de reacción constituye una prueba negativa que indica una concentración de endotoxina menor que la sensibilidad del Pyrotell. Aun cuando se ha formado un coágulo, la prueba es negativa si el coágulo se rompe o colapsa al ser invertido. La prueba del LAL es rápida, específica, fácil de realizar y altamente sensible. El Pyrotell puede detectar cantidades tan pequeñas como 0,03 unidades de endotoxina (UE) por mL, utilizando el método de coagulación (gel-clot).

Historia y Principio Biológico

Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1885 (3). En los años '50, en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, Bang descubrió que las bacterias Gram negativas causan la coagulación de la sangre de *Limulus* (4). Levin y Bang determinaron más tarde que la reacción es enzimática y que las enzimas están localizadas dentro de gránulos en los amebocitos (5). Demostraron que la coagulación es iniciada por un componente estructural único de la pared celular bacteriana denominado endotoxina o lipopolisacárido (6). La explicación actual de este proceso es que la que lleva a la formación del coágulo es una cascada de activación enzimática. Si bien la reacción completa no es entendida, el último paso ha sido bien descrito. La proteína de coagulación (coagulógeno) es desdoblada por la enzima de coagulación activada; los productos de desdoblamiento son insolubles y se unen mediante interacción iónica para formar la matriz del gel. Información adicional sobre la reacción del LAL y sus aplicaciones pueden encontrarse en la literatura existente(7, 8, 9).

Reactivo

El Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL) Pyrotell es envasado en forma liofilizada en tamaños de 2 ó 5 mL/vial. El Pyrotell contiene únicamente un extracto acuoso de amebocitos de *L. polyphemus*, 1,5 % v/v de albúmina sérica humana al 25% (estabilizante), 3 % de NaCl y otros iones apropiados. No se le han agregado preservativos, reguladores (buffers) u otros ingredientes.

Associates of Cape Cod, Inc. ofrece lotes individuales de Pyrotell con sensibilidades desde 0,03 a 0,5 EU/mL, basadas en el Estándar de Referencia de Endotoxina de USP (también denominada endotoxina estándar de referencia o RSE). La sensibilidad, λ, es la concentración mínima de RSE que produce un coágulo firme bajo condiciones estándar. La sensibilidad del lote, EU/mL, va impresa en las etiquetas del vial y del paquete. Especifique la sensibilidad deseada al hacer un pedido.

Use Pyrotell solamente para fines diagnósticos in vitro. No lo utilice para la detección de endotoxemia. La toxicidad de este reactivo no ha sido determinada, por lo tanto, al usar Pyrotell debe trabajar con precaución.

Reconstituya Pyrotell de la siguiente forma:

1. Golpee ligeramente el vial de Pyrotell para que el LAL suelto caiga al fondo del vial. Remueva el sello y levante el tapón gris para romper el vacío. No contamine la boca del vial; no inyecte a través de o vuelva a utilizar el tapón. La prueba no se verá afectada, si queda una pequeña cantidad de LAL en el tapón. Cubra el vial con Parafilm "M"® (American National Can™) cuando no esté en uso.
2. Reconstituya el Pyrotell con LAL Reagent Water (LRW agua para el reactivo LAL, véase "Reactivos de la Prueba") ó regulador compatible (Associates of Cape Cod, Inc.). Agregue 2,0 ó 5,0 mL según se indique en la etiqueta del vial. El LAL liofilizado entrará en solución en pocos minutos. Antes de utilizarlo, mezcle suavemente el contenido del vial para asegurarse de la homogeneidad de la solución. Si la mezcla se realiza con demasiado vigor, puede producirse un exceso de espuma y ésta a su vez puede ocasionar una pérdida de sensibilidad.

Condiciones de Almacenamiento

El Pyrotell congelado y deshidratado es relativamente resistente al calor y, si se mantiene refrigerado, conservará su actividad completa hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta del vial. Al recibir el producto, guárdelo a una temperatura entre -20 y +8°C. Las temperaturas inferiores a -20°C harán que el tapón se contraiga, ocasionando una pérdida de vacío y una posible contaminación del Pyrotell. Las temperaturas superiores a 37°C pueden provocar un rápido deterioro del Pyrotell liofilizado, como se evidencia por la pérdida de sensibilidad y un tono marcadamente amarillo del producto. El Pyrotell se embarca en recipientes insulados con refrigerante para protegerlo de temperaturas altas.

El Pyrotell reconstituido es normalmente transparente y ligeramente opalescente. Ocasionalmente, un lote exhibirá una turbidez leve y uniforme. La presencia de pequeñas fibras no es indicativa de contaminación ni afectará la actividad; sin embargo, una precipitación floculante o un marcado color amarillento indicaría deterioro.

El Pyrotell reconstituido es menos estable que el producto liofilizado; los viales pueden mantenerse hasta 24 horas entre 2 y 8°C. El Pyrotell reconstituido puede congelarse una vez. El producto retendrá su actividad durante tres meses si es congelado inmediatamente después de su reconstitución y es mantenido a una de -20°C o menos. Una vez descongelado, se aplican los mismo criterios visuales para calidad como en la reconstitución inicial.

Colección y Preparación de Muestras

Las muestras deben recogerse de una manera aséptica en recipientes no pirogénicos. Se recomienda recipientes reusables de vidrio despirogenado o de plástico poliestireno estériles y desechables, para minimizar la adsorción de entoxina en la superficie de los mismos. No todos los recipientes de plástico están exentos de un nivel de endotoxina detectable y alguna sustancia extraíble de algunos tipos de plástico puede interferir con la prueba del LAL. Los recipientes (seleccionados aleatoriamente de un lote) pueden ser enjuagados con una pequeña cantidad de LRW (a temperatura ambiente durante una hora) y el en puede analizarse una muestra para determinar si el lote es aceptable.

La mezcla de la reacción (muestra añadida al Pyrotell) debe tener un pH entre 6 y 8. Ajuste el pH de la muestra con HCl o NaOH (libre de endotoxina detectable) o regulador compatible (vea 3 abajo). Diluya el HCl o el NaOH concentrado con LRW a una normalidad que no lleve a una dilución significativa cuando se ajuste la muestra de la prueba. No ajuste el pH del agua o de la solución salina que no ha sido regulada.

Sustancias que desnaturalizan proteínas, quelan cationes, enlazan endotoxina o alteran el estado hidrofóbico de la endotoxina pueden interferir con la prueba. La interferencia puede ser percibida como la detección de una cantidad de endotoxina significativamente mayor o menor a la esperada cuando una cantidad predeterminada de endotoxina estándar ha sido agregada a la muestra (véase "Limitaciones de Procedimiento"). En la mayoría de los casos, la dilución de la muestra reducirá la concentración y actividad de las sustancias que interfieren y aunque se diluya la muestra se podrá obtener resultados válidos. Los controles y los esquemas de dilución adecuados son discutidos en la sección "Procedimiento de prueba".

Las muestras deberán se realizadas lo más pronto posible después de su recolección. Puede ser prudente congelar una muestra no estéril que será guardada o transportada antes de ser analizada. Las muestras que se espera contengan concentraciones bajas de endotoxina (menos de 1 EU/mL) deben ser analizadas para determinar si hay pérdida de endotoxina durante el período de almacenaje.

Procedimiento de la Prueba

Reactivos de la Prueba

1. *Vial de Pyrotell de pruebas múltiples* (vea descripción y método de reconstitución en la sección anterior).
2. *Agua para el reactivo LAL (LRW)*, no se incluye con el Pyrotell; debe ordenarse por separado. El Pyrotell liofilizado debe ser reconstituido con agua que no muestre endotoxina detectable con la prueba LAL. Las fuentes recomendadas incluyen Associates of Cape Cod, Inc. o Agua Estéril para Inyección o Irrigación (según WFI, sin bacteriostatos). El límite de endotoxina para el WFI USP es 0,25 EU/mL, por consiguiente puede tener un contenido detectable de endotoxina al ser analizado con un Pyrotell más sensible. Para certificar un nuevo lote de agua como un LRW, reconstituya el Pyrotell y prepare diluciones de endotoxina estándar con el nuevo lote de agua para confirmar la sensibilidad del Pyrotell. Si se confirma la sensibilidad del lote y el control negativo no muestra un incremento de la viscosidad ni una precipitación floculenta, el agua es adecuada para su uso. Utilice LRW para reconstituir el Pyrotell y la endotoxina estándar, así como para las diluciones del estándar y de las muestras.
3. *Regulador*, no se incluye con el Pyrotell; ordénelo por separado si se necesita. El regulador Pyrosol (Cat# BR051 o BC554) ó regulador Glucashield™ (Cat# GB051) puede utilizarse en lugar del LRW para reconstituir el Pyrotell con el fin de resolver una interferencia de los glucans o un problema con el pH de una muestra.
4. *Endotoxina estándar*, no se incluye con el Pyrotell; debe ordenarse por separado. La Endotoxina Estándar para Control (CSE, Control Standard Endotoxin), procedente de Associates of Cape Cod, Inc., es utilizada para confirmar la sensibilidad del Pyrotell, validar producto y preparar controles de inhibición. Cada vial contiene un peso medido de endotoxina. La Endotoxina Estándar de Referencia de la USP puede ser obtenida por medio del U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Siga las instrucciones del fabricante para la reconstitución y almacenamiento de las endotoxinas estándar. Los lotes de CSE pueden presentar potencias (EU/ng) distintas cuando son analizadas con diferentes lotes de Pyrotell. Solicite un Certificado de Análisis para la potencia de un CSE con un lote específico de Pyrotell.

Materiales y Equipo (no provistos)

1. *Tubos para reacción* de 10 x 75 mm, despirogenizados, de vidrio "flint" (Cat# TS050) (cal sódica). Algunas marcas exhiben propiedades inhibitorias con ciertos lotes de Pyrotell. Los tubos despiro-genizados pueden ser adquiridos por medio de Associates of Cape Cod, Inc.
2. *Baño de agua sin circulación* o incubadora de bloque seco (Cat# TH120), capaz de mantener una temperatura de 37 ± 1°C.
3. *Gradilla o soporte para sostener* y/o incubar los tubos de reacción.
4. *Pipetas*, pipetas automáticas con puntas de pipeta (tips) pipetas de repetición con jeringas de plástico. Se recomienda el uso de desechables, estériles.
5. *Mezclador del tipo "vortex"*.
6. *Parafilm "M"*.® El lado en contacto con el papel es, por lo general, no pirogénico.
7. *Tubos de ensayo no pirogénicos* con una capacidad adecuada para preparar diluciones de endotoxina estándar o de las muestras la prueba (los tubos de ensayo de vidrio de 18 x 150 mm con cierres Morton de acero inoxidable son reutilizables y prácticos). Véase "Colección y Preparación de Muestras" para otros recipientes apropiados para diluciones.
8. *Horno de aire* seco con la capacidad de alcanzar temperaturas de 250°C para la despirogenización de artículos de vidrio. Lo común es un tiempo de 30 minutos a una temperatura de 250ºC (2, 11).

Controles

Los controles son necesarios para asegurarse de la validez de la prueba. Los procedimientos recomendados están especificados por la FDA (1) y la USP (2).

1. **Controles de endotoxina**
   a. **Serie de endotoxina estándar**: Prepare cada día una nueva serie de diluciones de la endotoxina concentrada. Prepare las diluciones de manera que se obtenga una serie final de diluciones factor dos que englobe la sensibilidad (λ) del Pyrotell. Se recomiendan concentraciones de 2λ, λ, 0,5λ y 0,25λ para confirmar la sensibilidad del Pyrotell. Para alcanzar el nivel máximo de precisión, haga lo menos posible de diluciones como le sea posible usando volúmenes apropiados de pipeta.
   b. **Controles positivos** pueden ser empleados, bajo ciertas circunstancias, en la ausencia de una serie de concentraciones estándar. Consulte la guía de la FDA (1) bajo "Routine Testing of Drugs by the LAL Test" para obtener detalles. La concentración final de la endotoxina añadida al control positivo debe ser 2λ.
   c. **Controles positivos** del producto son controles de inhibición y consisten en la muestra en una dilución de la muestra a la que se añade endotoxina estándar. La concentración final de la endotoxina agregada a la muestra de la prueba debe ser 2λ.
2. **Controles negativos**
   Control(es) negativo(s) de LRW debe(n) incluirse con cada grupo de muestras analizadas. Durante la validación o la prueba de inhibición/potenciación del producto (1,2), la muestra utilizada para diluir la endotoxina estándar cumple también las funciones de un control negativo.

Preparación de la Muestra para una Cuantificación o Prueba de Límites

Diluya la muestra a la concentración deseada para realizar una prueba de límites (pasa/falla) o realice una cuantificación por medio del análisis de una serie de concentraciones (la sección de "Resultados e Interpretación" da ejemplos de los tipos de prueba). Las diluciones pueden llevarse a cabo en tubos de ensayo y el volumen de prueba puede transferirse a los tubos de reacción o bien las diluciones pueden prepararse directamente en los tubos de reacción dejando el volumen de la prueba, 0,1 mL, en cada tubo. La dilución que será analizada en una prueba de límites es determinada por la sensibilidad del Pyrotell y el límite de endotoxina de la muestra. Consulte "Limitaciones del Procedimiento" o la guía de la FDA (1) para la explicación y cálculo de la Mínima Concentración Válida (MCV) y de la Máxima Dilución Válida (MDV).

Realización de la Prueba

Es necesario emplear una **técnica consistente** para obtener resultados satisfactorios.

1. Añada 0,1 mL de Pyrotell reconstituido a cada tubo de reacción que contenga 0,1 mL de control o muestra de la prueba. Utilice una pipeta graduada (incrementos de 0,1 mL) o pipeta automática o de repetición. Añada Pyrotell al/los control/es negativo/s primero y luego desde la concentración más baja a la más alta en cada serie de las pruebas donde la contaminación pueda suponer un problema. Se recomienda utilizar una pipeta o punta de pipeta nueva cada vez que se remueva Pyrotell del vial. Agite la gradilla de tubos vigorosamente durante 20 a 30 segundos para asegurarse de que estén completamente mezclados. Si hay pocos tubos, cada uno puede ser mezclado en el mezclador tipo "vortex" durante 1 a 2 segundos. El mezclar de una forma inadecuada frecuentemente resulta en una prueba no satisfactoria.
2. Coloque los tubos de reacción en un bloque seco o en un baño de agua a 37 ± 1°C durante 60 ± 2 minutos. La reacción se inicia cuando se añade LAL a la muestra, pero no procede a una velocidad óptima hasta que la mezcla alcanza una temperatura de 37°C. Si se analiza un número grande de muestras en paralelo, las pruebas deberán agruparse e iniciarse a intervalos que permitan la lectura de cada una de ellas dentro del límite de tiempo.
   No mueva los tubos de reacción durante el período de incubación. La formación de coágulo es un reacción delicada y puede ser irreversiblemente terminada si los tubos son manipulados, agitados o si sufren algún tipo de vibración. No utilice un baño de agua con un agitador u otra fuente de vibración. Sumerja los tubos por encima del nivel de la mezcla de la reacción pero no tan profundamente que los tubos floten o se muevan en las gradillas.
3. Retire y lea los tubos de reacción uno por uno. No seque ni golpee los tubos contra los lados de la gradilla al removerlos. Invierta el tubo con un movimiento uniforme; no haga ninguna pausa cuando este realizando la inversión a menos que sea obvio que el coágulo no se ha formado. Una prueba positiva es indicada por la formación de un coágulo que no se colapsa al invertir el tubo.

Resultados e Interpretación

Ejemplo de una Serie de Endotoxinas Estándar

Confirme la sensibilidad del Pyrotell y califique al laboratorio o técnico realizando la prueba del LAL con una serie de concentraciones conocidas de endotoxina estándar (1,2) que engloben la sensibilidad indicada en la etiqueta del producto (i.e., 2λ, λ, 0,5λ y 0,25λ). Para este ejemplo, la sensibilidad (λ) del Pyrotell es 0,25 EU/mL:

Concentración de Endotoxina	*Resultado de la Prueba*
0,5 EU/mL (2λ)	+
0,25 EU/mL (λ)	+
0,125 EU/mL 0,5λ)	–
0,06 EU/mL (0,25λ)	–
LRW (control negativo)	–

El punto final de este ensayo se define como la concentración mínima de endotoxina necesaria para obtener un resultado positivo. La sensibilidad indicada en la etiqueta del Pyrotell se confirma si el punto final es λ más o menos una dilución factor dos. En este ejemplo, la concentración de endotoxina en el último tubo positivo de la serie es 0,25 EU/mL o λ; por lo tanto, la sensibilidad se confirma. La prueba sería válida (sensibilidad confirmada) si el punto final estuviera entre 0,125 y 0,5 EU/mL (el margen de error del método). Para mostrar un punto final de 0,125 EU/mL, la concentración de 0,06 EU/mL debe estar presente en la serie y debe ser negativa.

Cuando se replica el ensayo de la endotoxina, la sensibilidad se expresa como la media geométrica (GM) de las sensibilidades individuales:

$$GM = \text{antilog}\ ((\Sigma e)\ /\ f)$$

donde Σe = suma de los logaritmos de los puntos finales y f = número de réplicas de puntos finales.

El **control negativo** de LRW debe dar un resultado negativo. Si el control negativo forma un coágulo, el LRW, los artículos de vidrio o el Pyrotell están contaminados. La mezcla debe ser transparente y sin un incremento en la viscosidad. Una precipitación floculenta indica una concentración de endotoxina menor que la sensibilidad del Pyrotell.

En la ausencia de una serie de endotoxina (1), puede incluirse un **control positivo** con las pruebas. El control positivo con 2λ corresponde a la concentración de 0,5 EU/mL en el ejemplo anterior. Si el control positivo da un resultado negativo, la sensibilidad del Pyrotell es menor que el doble de la sensibilidad indicada en la etiqueta y la prueba de la muestra es inválida. Una pérdida de sensibilidad puede indicar un deterioro del Pyrotell, una pérdida de potencia de la endotoxina (a menudo debida a su adsorción a la superficie del recipiente) o una ejecución incorrecta de la prueba.

Ejemplo de una Prueba de Límites (Pasa/Falla)

Es posible analizar una sola concentración de una muestra con una sensibilidad del Pyrotell dada y que el resultado indique si la muestra de la prueba tiene más o menos endotoxina que su límite. En este ejemplo, la concentración de la muestra es 1 mg/mL y el límite de endotoxina deseado o predeterminado para la muestra es 3 EU/mg (véase "Limitaciones del Procedimiento"). El límite expresado en EU/mL,

$$(3\ EU/mg)\ (1\ mg/mL) = 3\ EU/mL,$$

es mayor que la sensibilidad del Pyrotell, 0,25 EU/mL, por lo que es necesario diluir la muestra para realizar una prueba de límites. Determine la dilución de la muestra que indicará que pasa (< 3 EU/mL) o falla (≥ 3 EU/mL) la prueba, dividiendo para ello el límite de endotoxina en EU/mL entre la sensibilidad del LAL:

$$3\ EU/mL\ /\ 0,25\ EU/mL = 12.$$

Combine una parte de muestra con 11 partes de LRW para lograr la dilución 1:12 y haga el análisis. El resultado indicará si la muestra pasa la prueba al límite de 3 EU/mL. Se incluyen controles positivos del producto utilizando la dilución de la muestra para descartar los resultados negativos falsos.

Ejemplo de la Cuantificación de una Muestra

La endotoxina se cuantifica en una prueba encontrando el punto final en una serie de diluciones de la muestra. En el siguiente ejemplo, la muestra se diluye con LRW y las diluciones indicadas en el cuadro se analizan; λ es 0,25 EU/mL. Los resultados se toman como positivos o negativos.

Dilución de la Muestra	*Resultado de la Prueba*
sin diluir	+
1 : 2	+
1 : 4	+
1 : 8	–
1 : 16	–
1 : 32	–
control negativo	–

Para calcular la concentración de endotoxina en la muestra, multiplique la sensibilidad (λ) del Pyrotell por el recíproco de la dilución en el punto final:

$$\text{Conc.} = (\lambda)(4/1) = (0,25\ EU/mL)(4) = 1\ EU/mL.$$

La concentración de las réplicas de la misma prueba se expresa como la media geométrica.

Un **control positivo del producto** (muestra a la que se le ha agregado 2λ de endotoxina estándar) debe estar presente y resultar positivo para descartar resultados negativos falsos. Si el control positivo del producto resulta negativo y el control positivo da un resultado positivo, la muestra está interfiriendo con (inhibiendo) la prueba del LAL. En este caso, la muestra debe ser reanalizada a una dilución mayor (sin exceder la MDV; véase "Limitaciones del Procedimiento").

Limitaciones del Procedimiento

El procedimiento es limitado por la capacidad de la muestra para inhibir o potenciar la prueba del LAL. Si el procedimiento no puede ser validado (1,2) a una concentración de la muestra mayor que la MCV entonces la prueba del LAL no puede sustituir la Prueba de Pirógenos de la USP ("Pyrogen Test"). La MCV se calcula de la siguiente forma:

$$MCV = \frac{(\lambda)(\text{dosis de la muestra})}{\text{límite de tolerancia a la endotoxina}}$$

donde λ es expresada en EU/mL, la dosis de la muestra en unidades por Kg de peso del cuerpo, y el límite de tolerancia a la endotoxina en EU/Kg.

La Máxima Dilución Válida se define como la dilución de la muestra que contiene la MCV (1) y es igual a la concentración inicial de la muestra dividida por la MCV.

El límite de tolerancia a la endotoxina (1) es 0,2 EU/kg para drogas administradas por una vía intratecal y 5 EU/kg. para otros parenterales. El límite para dispositivos médicos se expresa por mL de un volumen de extracto o enjuague obtenido de la forma descrita en la guía de la FDA (1). El límite para dispositivos que entran en contacto con el líquido cefalorraquídeo es 0,06 EU/mL y para aquellos que no tienen contacto con el límite es 0,5 EU/mL. El límite para dispositivos líquidos es el mismo que el límite para drogas.

La tripsina causará un positivo falso, a menos que sea desnaturalizada mediante un tratamiento de calor antes del análisis. Materiales tales como la sangre, el suero y el plasma deben ser tratados para desactivar cualquier inhibidor antes de la prueba (12).

Valores Previstos

La endotoxina puede ser cuantificada si la concentración es mayor o igual a la sensibilidad del Pyrotell. Los materiales derivados de fuentes biológicas pueden contener niveles mensurables de endotoxina aún después de una purificación bioquímica. El agua obtenida mediante destilación, ósmosis inversa o ultrafiltración puede contener menos endotoxina de la detectable siempre y cuando el proceso de purificación opere correctamente y el agua no sea contaminada después de producción.

Características Específicas de Función

El margen de error del método de coagulación es del doble a la mitad del punto final de la prueba.

Bibliografía

1. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, Current USP.
3. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of Limulus polyphemus, Callinectes hastatus, and Cucumaria sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
4. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on Limulus and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
5. Levin, J., y F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
6. Levin, J., y F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
7. Levin, J., y F. B. Bang. 1968. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
8. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
9. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, y T. J. Novitsky (editores), Alan R. Liss, Inc., NY.
10. Tsuji, K. y S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
11. Sweet, B. H. y J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. En: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. En: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.

Nuestro personal capacitado tendrá el gusto de discutir con usted los aspectos teóricos y prácticos de la prueba del LAL. No dude en llamarnos si encuentra problemas al utilizar Pyrotell. Repondremos cualquiera de nuestros productos cuyo rendimiento no llegue a satisfacer las especificaciones del producto. Toda devolución de productos debe ser notificada de antemano.

Limulus Amebocyte Lysate

Lysat d'Amoebocytes de *Limule*
Limulus Amöbozyten-Lysat
Lisato di Amebociti di *Limulus*
Lisado de Amebocitos de *Limulus*

PYROTELL®

Multitest Vial / Flacon à essais multiples
Multitest-Fläschchen / Fialla multitest
Vial para Pruebas Múltiples

Telephone / Téléphone / Telefon / Telefono / Teléfono: (508) 540-3444
Facsimile / Télécopie / Fax / Fax / Facsímil: (508) 540-8680
Technical Assistance / Aide technique / Technische Unterstützung / Assistenza tecnica / Asistencia Técnica: (800) 848-3248
Customer Service / Service clientèle / Kundendienst / Servizio assistenza clienti / Servicio al Cliente: (800) 525-8378

Manufactured by:
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. St. Jean Dr. ▪ E. Falmouth, MA 02536

U.S. License #700
PN000858 REV5
April 2015