

English
LIMULUS AMEOCYTE LYSATE

PYROTELL®

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

The *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test, when using 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 amoebocyte lysate is an apparatus extract of blood cells (amoebocytes) 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 deep-welled, flat (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, the gel 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 that 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

Howard 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 amoebocytes (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* Amoebocyte Lysate (LAL) is packaged in lyophilized form in 2, 5, and 10 mL vial fill sizes. Pyrotell contains only *Limulus* amoebocytes of *Limulus polyphemus*, 1.9% v/v of 25% human serum albumin (stabilizers), 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 0.25 EU/mL based on Endotoxin Reference Standard (EU) or reference to 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 a package label. Specify the sensitivity desired when placing an order. Use the Pyrotell in vitro diagnostic procedure 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 inhale the dust. Add 1.0 mL of reconstituted water to the vial. The water 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 distilled water. Add 1.0 mL of LRW to each vial. The water will not affect the test. 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 expiration date on the vial label. Store the product at 20 ± 4°C. Temperatures below -20°C should be avoided, 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 temperature reconstituted Pyrotell. Pyrotell is stable for 12 months at 20 ± 4°C. The product will exhibit a slight, uniform browning. 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-sterile plastic containers. Reused, decontaminated glassware and sterile, disposable, polystyrene plasticware 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 narrow tube 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 endotoxins) or compatible buffer. See #3 below. If white coloration (HCl) or turbidity (NaOH) is observed, the sample is not suitable. The result indicates whether or not the test specimen has a given sensitivity and its limit. In this example, the specimen 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 is

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

is greater than the sensitivity of the Pyrotell, 0.25 EU/mL, so the specimen must be diluted to perform a pass/all 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 Pyrotell.

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 control specimens are included at the specimen dilution to rule out false negative results.

Test Procedure

Test Reagents

1. *Pyrotell multitest vial* (see description and method of reconstitution in section above).
2. *LRW*, not provided with Pyrotell, under 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 bacteriostats). The endotoxin limit for USP WFI is 0.25 EU/mL; therefore, WFI may have detectable endotoxin when tested with the USP Reference Standard but not with a lot of reconstituted 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. The procedure for reconstituting Pyrotell and endotoxin standards and to dilute endotoxin standards and test specimens.
3. *Buffer*, not provided with Pyrotell, used separately if required. Pyrotell buffer (Cape BR05 or BC54) or Glacohelid™ buffer (CAF CR05) can be used instead of LRW to reconstitute Pyrotell help overcome a sample pH problem. Pyrotell buffer will not lead to significant endotoxin adsorption. Pyrotell buffer (Cape BR05 or BC54) or Glacohelid™ buffer (CAF CR05) can be used instead of LRW to reconstitute Pyrotell.
4. *Standard Endotoxin*, not provided with Pyrotell, offered 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 known weight of standard endotoxin, USP Reference Standard may be used to confirm the U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc. Follow manufacturers' directions for reconstitution and storage of standard endotoxins. CSE lots may show different potencies (EU/mg) when tested with various lots of Pyrotell. Request a Certificate of Analysis for the potency of a CSE with a specified lot of Pyrotell.

1. *Inoculation tubes*, 10 x 75 mm, deep-welled, flat (soda lime) glass. (CAF T3505). Some brands exhibit inhibitory properties with certain lots of Pyrotell. Deep-welled tubes are available from Associates of Cape Cod, Inc.
2. *Noncirculating water bath* or dry block incubator (CAF TH120) capable of maintaining 37±1°C.
3. *Test tube racks* to hold and/or incubate reaction tubes.
4. *Pipets*, automatic pipettors with pipet tips, or repeating pipettes with plastic syringe barrels. Sterile, disposable are recommended.

5. *Vortex-type mixer*.
6. *Parafilm M™* The slide 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 deproteination 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).

Limitations of Procedure

1. **Endotoxin standard series.** Prepare a fresh set of dilutions from the stock endotoxin solution each day. Make dilutions such that a final series of endotoxin 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 pipette-volumes to maximize accuracy.
2. **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 consists of a specimen of 0.25 EU/mL.
3. **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 must be ≥2λ.

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/all) 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" (1) for explanation and calculation of Minimum Vial Concentration (MVC) and Maximum Vial 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 pipette. 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 minutes. Mixing is not adequate if a common cause of consistency factors.
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 result in the end of each within the time limit.
3. 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 liquid level in the reaction tubes but do not touch the tubes. Do not touch the tubes.
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 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 is the sensitivity, 0.25 EU/mL or, therefore, the sensitivity is confirmed. The test would be valid 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.

$$GM = \text{antilog} (\Sigma \log)$$

where Σ = sum of log endpoints, and n = number of endpoint points.

The **LRW negative control** should give a negative test. If the negative control clots, the LRW, however, as 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 0.5 EU/mL level is 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 Specimen Assay

Endotoxin is quantified in an assay by dividing 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	-

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 control specimens are included at the specimen dilution to rule out false negative results.

Example of a Specimen Assay

Endotoxin is quantified in an assay by dividing 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:

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

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

Positive product controls are inhibition controls and consist of the specimen or dilution of specimen to which 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

1. 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 the 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 (ETL) 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 extraction or rinse volume according 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 medical devices is expressed in that form for the purpose of this guideline.

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 a substance known as 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* Amoebocyte 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. 1985. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucarumia* sp. Johns Hopkins University Circular 434-5.
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. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxins. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
6. Hopkins, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Occams 27:13-18.
7. Tampon, N. and J. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: 21. Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amoebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
8. Tujii, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
9. Swett, R. H. and J. F. Haxell. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7. 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
10. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
11. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxins. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Occams 27:13-18.

Content of most of the examinations used simply as possible after pre-testing. It is recommended to congelate an examination on sterile soil that do it conservé or expédié avant l'essai. Les échantillons contents ont des faibles concentrations d'endotoxines (inférieures à 1 EU/mL) doivent être testés afin de vérifier la performance de tests d'endotoxines lors du stockage.



The Pyrotell reconstituted est généralement transparent et légèrement opalescent. Un lot peut parfois présenter une légère turbidité uniforme. La présence de petites fibres ou du film noir sur un vase ou une couleur jaune caractéristique indiquent une détérioration.

The Pyrotell reconstituted est moins stable que le produit lyophilisé et les flacons peuvent être conservés pendant 24 heures maximum à une température comprise entre 2 et 8°C. Le Pyrotell reconstituted 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.

Prélevement des échantillons et préparation

Les échantillons doivent être prélevés aseptiquement dans des récipients aseptiques. L'usage de récipients en verre dépoliés 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 ce type de endotoxine. 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.

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

Les substances qui dénaturent les protéines, chauffent les catalyses, 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'étoxin d'endotoxine est ajoutée à l'échantillon (voir les "Limites de méthode"). Dans la plupart des cas, la dilution de l'échantillon tend à réduire la concentration et l'activité des substances interférentes, et produit quand même des résultats de tests valides. Les contrôles appropriés et les modes de dilution sont décrits à la section "Protocole opératoire".

Le contrôle négatif de LRW doit produire un test négatif. Si les contrôles négatifs se coagulent, LRW le récepteur ou le Pyrotell est contaminé. Le mélange doit être transparent, sans augmentation de viscosité. Une précipitation - en floccos - ou floccosuse indique une concentration d'endotoxine inférieure à la sensibilité du Pyrotell.

En l'absence de la gamme d'étoxin 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 de 0.5 EU/mL. 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 a été contaminé efficacement.

Protocole

Réactifs/essai

1. *Flacon de Pyrotell à essais multiples* (voir la description et la méthode de reconstitution à la section précédente).
2. *LRW* (eau pour réajuster LAL, non fournie avec Pyrotell; doit être commandée séparément. Utilisez l'échantillon dilué et/ou reconstitué avec de l'eau qui ne présente pas d'endotoxines détectables au cas 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 stérile sans bactériostatique). La limite d'endotoxines pour l'eau stérile USP est de 0.25 EU/mL; cette eau peut donc présenter un niveau d'endotoxines détectable lorsqu'elle est testée au moyen d'un Pyrotell plus sensible. Pour vérifier ce qu'un nouveau lot d'eau est conforme à la LRW requise, reconstituer le Pyrotell et réaliser des dilutions d'étoxin 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 floccosuse, 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 Pyrotell (CAF BR05 ou BC054) ou tampon Glacohelid™ (CAF CR05) plutôt qu'à LRW en vue de reconstituer le Pyrotell afin d'éliminer un problème de pH dans un échantillon ou interférence de glucose.
4. *Étoxin d'endotoxine*, non fournie avec le Pyrotell; doit être commandée séparément. Utilisez 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 mesurés. On peut obtenir l'étalon d'endotoxine de référence USP auprès de la U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc. Suivre les directives du fabricant relatives à la reconstitution et au stockage des étalons d'endotoxines. Les lots d'étalons d'endotoxine peuvent présenter des puissances différentes (EU/mg) 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.

Associer un volume d'échantillon avec 11 volumes de LRW pour obtenir la dilution au 1 : 12 et les 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.

Quantifier les endotoxines dans un essai en établissant le point final dans une série de dilutions de l'échantillon. Dans l'exemple ci-dessus, l'échantillon est dilué avec LRW et les dilutions dans le tableau sont testées à 12, 6, 3, 1.5, et 0.75 EU/mL. Les résultats sont marqués par positif et négatif.

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

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

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

Le contrôle négatif de LRW doit produire un test négatif. Si les contrôles négatifs se coagulent, LRW le récepteur ou le Pyrotell est contaminé. Le mélange doit être transparent, sans augmentation de viscosité. Une précipitation - en floccos - ou floccosuse indique une concentration d'endotoxine inférieure à la sensibilité du Pyrotell.

En l'absence de la gamme d'étoxin 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 de 0.5 EU/mL. 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 a été contaminé efficacement.

Quantifier les endotoxines dans un essai en établissant le point final dans une série de dilutions de l'échantillon. Dans l'exemple ci-dessus, l'échantillon est dilué avec LRW et les dilutions dans le tableau sont testées à 12, 6, 3, 1.5, et 0.75 EU/mL. Les résultats sont marqués par positif et négatif.

Calculer la concentration d'endotoxines dans l'échantillon, multiplier la sensibilité du Pyrotell (λ) par

↳, dadurch ist die Empfindlichkeit beidseitig. Der Test wird gültig (die Empfindlichkeit beidseitig), wenn der Endpunkt zwischen 0,125 und 0,5 EU/ml, (der Fehler der Methode) liegt. Um einen Endpunkt von 0,125 EU/ml anzuzeigen, muß der Gehalt 0,06 EU/ml in der Formel vorhanden und negativ sein.

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

$$GM = \sqrt[n]{\sum (Z_i)} / n$$

wobei \sum = Summe der Log-Endpunkte und n = Anzahl der Endpunkte bei Mehrfachbestimmungen.

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

In keine Endotoxin-Reihe vorhanden (1), kann eine **Positivkontrolle** mitgeführt werden. Die Positivkontrolle mit Z2 entspricht dem Gehalt von 0,5 EU/ml, im oben angeführten Beispiel. Falls die Positivkontrolle negativ aus, ist die Pyrotell-Empfindlichkeit geringer als die doppelte gekonzentrierte 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 angeht. In diesem Beispiel beträgt die Konzentration der Probe 3 EU/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,

$$3 \text{ EU/mg} / (1 \text{ mg/ml}) = 3 \text{ EU/ml.}$$

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 bestimmt, wie 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.

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

den Test 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 mischen, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Beispiel einer Probeanalyse
Endotoxin wird durch Analyse quantifiziert, indem der Endpunkt in einer Serie von Probeverdünnungen 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 Untersuchungssprobe	Testergebnis
unverdünt	+
1 : 2	+
1 : 4	+
1 : 8	-
1 : 16	-
1 : 32	-

Um die Konzentration des Endotoxins in der Probe zu berechnen, die Pyrotell-Empfindlichkeit (λ) durch die Verdünnung der Probe mit LRW dividieren:

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

Die Konzentration der Mehrfachbestimmungen wird als geometrischer Mittelwert ausgedrückt. Eine **positive Produktkontrolle** (Interuchungssprobe mit Z2 Standard-Endotoxin) verwendet muß vorhanden sein und positive ausfallen, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Wenn die positive Produktkontrolle negativ und die Positivkontrolle positiv ist, stört (bennt) 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

Dies Verfahren wird durch die folgenden Faktoren (Z1) zu hängen oder zu versäulen. Wenn das Verfahren bei einer Probekonzentration (MVD) oberhalb der minimal zulässigen Konzentration (MZK) nicht validiert werden kann (1, 2), kann der LAL-Test nicht als Ersatz für den USP-Pyrogenentest dienen. Die MZK wird folgendermaßen berechnet:

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

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

Die maximale zulässige Verdünnung (MVD) 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 intrathal verabreicht werden, und 3 EU/kg für alle anderen Parenterale. Der Grenzwert für Medizinprodukte wird pro mL Extrakt berechnet und angegeben, 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.

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

Zu erwartende Werte

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

Charakteristika der Methode

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

Bibliographie

- 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.
- Bacterial Endotoxin Test, USP 29 NF 21, 2003.
- Howell, W. H. 1985. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, Callicetes hastans, and *Carcarius* sp. Johns Hopkins University Circular 434-5.
- 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.
- Levin, J., und F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
- 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.
- 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.
- Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
- 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.
- Tsujii, K. und S. I. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
- Sweet, R. H. und J. E. Havelock. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
- Gold, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-138. 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®

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 del pirigeni (test della febbre del coniglio, riconosciuto dalla Farmacia Statunitense (USP), per testare prodotti finiti quali i "farmaci iniettabili non a forma iniezione (inchi) o prodotti farmaciai", farmaci iniettabili a forma iniezione (inchi) o prodotti farmaciai", e prodotti farmaciai). 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 "ristoccato" a 0,1 ml di campione da esaminare all'interno di una provetta da saggio in vetro "tintato" (solca calcaica) da 10 x 75 mm, depirogenata. La soluzione reagente 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 endotossine è minore della sensibilità del Pyrotell. Anche quando il gel si forma, ma si rompe o crolla durante l'incubazione, il test risulta essere negativo. Il LAL, test è rapido, semplice, facile da eseguire ed economico. Utilizzando la tecnica di gelificazione, il Pyrotell può rilevare unità endotossiniche (Endotoxin Units o EU) in quantità piccole fino a 0,033/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 dettero il prodotto risultante negativo ed il controllo positivo che gli esamini sono simili nei grandi 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 del controllo del campione alle diverse fasi dell'intero ciclo della reazione, e cioè: 1) tuttavia in grado di descrivere minuziosamente l'ultimo passaggio. La proteina coagulante (coagulogeno) viene scissa dall'enzima coagulante attivato e i prodotti insolubili della scissione si uniscono mediante una interazione ionica, ad 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 solamane 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, tensioattivi od altri ingredienti.

Presenti in ogni ampolla, sono raccomandate per confermare la sensibilità del Pyrotell con sensibilità comprese fra 0,03 e 0,5 EU/ml, in conformità alla USP Endotoxin Reference Standard (Endossina Standard di Riferimento della Farmacopea Statunitense), nota anche come Reference Standard Endotossina o RSE. La sensibilità λ , è dunque la concentrazione minima di endotossina necessaria per ottenere un risultato positivo.

Utilizzare il Pyrotell positivo per eseguire esami diagnostici in vitro. Non utilizzare questo prodotto per rilevare l'endossina. 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 colpoetto leggero alla fiala del Pyrotell di modo che il reagente LAL scenda sul fondo della fiala. Togliere la ghiera di alluminio ed eliminare i vuoti alzando leggermente il tappo grigio. Non contaminare l'imboccatura della fiala né perforare il tappo o riutilizzare quest'ultimo. Una piccola quantità del LAL, miscelata con acqua sterile, può essere usata con il paraffina "M"® (fornicato dalla American National Can)™ quando non viene usata.

2. Ricostituire il Pyrotell su acqua per LAL (LAL Reagent Water™ LRW, vedi sotto) o con il tampone compatibile (disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc.). Aggiungere 2,0 ± 0,5 ml di acqua sterile indicata sull'etichetta della fiala. Il contenuto si discioglie in pochi minuti. Il risultato 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 reagitività 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 a 0°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'eventuale colorazione giallastra del prodotto. Il Pyrotell viene spedito con materiale refrigerante all'interno di contenitori isolati, in grado di proteggere i prodotti da temperature eccessive.

Il Pyrotell "ristoccato" si gonfia rapidamente e leggermente opalescente. A volte certi esamini non presentano una piccola ed uniforme torbidità. La presenza di piccole fibre o filamenti non sta ad indicare l'eventuale contaminazione né influenza sull'analisi; tuttavia, una opalescenza flocculante oppure un nastro colorato 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 aseptico all'interno di contenitori apirigeni. Si raccomanda di utilizzare articoli di vetro già riutilizzati e depirogenati, o di polistirene sterile monouso, per minimizzare l'assorbimento di endotossina sulle superfici dei contenitori. Non tutti i contenitori di plastica sono privi di endotossine 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 LRW (acqua per LAL) a temperatura ambiente per la durata di un'ora), dopo di che la soluzione di risciacquo, fucugando 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 endotossine percettibile) a tampone compatibile (vedere § 3 qui sotto). Diluire il componente chimico HCl o NaOH con LRW di acqua a raggiungere un livello accettabile che non comporti una diluizione sensazionale del campione in esame una volta che è stato regolato. Non alterare il pH della soluzione salivale prima di tamponare o dell'acqua.

Sostanze che deturano le protine, rendono i cationi chelati, legano l'endossina oppure alterano lo stato idrorepellente dell'endossina, 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 seguito il controllo su una quantità nota di endotossina standard (vedere la sezione "Limiti della procedura"). Nella maggior parte dei casi il diluimento del campione ridurrà la concentrazione e l'attività delle endotossine che interferiscono, garantendo tuttavia risultati validi del test. Controlli adeguati ed un metodo di diluizione vengono discussi nella sezione "Procedimento del test".

I campioni raccolti devono essere sottoposti quanto prima all'esame. Si consiglia di congelare i campioni non sterili che vengono immagazzinati o spediti prima all'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 multiscopo Pyrotell** (leggere la descrizione ed il metodo di ricostituzione descritto nella sezione sopra indicata).

2. **LRW (acqua per LAL)**, da ordinare separatamente in quanto non viene fornito 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 endotossine percettibili al LAL test. Il limite di endotossina nella WFI della Farmacopea Statunitense è di 0,25 EU/ml, perciò la WFI potrebbe presentare endotossine percettibili qualora presenti con il Pyrotell maggiormente sensibile. Per determinare se un nuovo lotto di acqua presenta le stesse caratteristiche del LRW, occorre ricostituire il Pyrotell ed effettuare diluizioni dell'endossina 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 LRW 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 Pyrotell (Capr LAL) o BCS51 o tampone Glucosidico™ (Capr GB851) può sostituire l'acqua reagente per LAL, per ricostituire il Pyrotell ed aiutare a superare problemi di gel nel campione oppure un'interferenza dai glucani.

4. **Endossina standard (Standard Endotossina)**, da ordinare separatamente in quanto non viene fornito con il Pyrotell. L'endossina standard di controllo (Control Standard Endotossina 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 riferimento. Ogni fiala contiene un peso misurato di endotossina. L'endossina standard di riferimento (Endotossine 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/mg) 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.

Materiale ed apparecchiature (non inclusi)

- Provette da saggio, 10 x 75 mm, in vetro "tint" (Capr TNS60) (soda calcica), apirogene. Alcune marche sono caratterizzate da proprietà idrauliche qualora abbinato ad alcuni lotti di Pyrotell. Le provette apirogene sono preparate da Associates of Cape Cod, Inc.
- Bagnomaria ad acqua non circolante, oppure incubatore a secco (Capr TH120), in grado di mantenere una temperatura di 37 ± 1°C.
- Supporti in grado di sostenere e/o incubare le provette da saggio.
- Pipette micropipetta con puntali, oppure pipette automatiche a ripetizione per siringhe. Si raccomanda l'uso di prodotti sterili monouso.
- Agitatore vortex.
- Panfilin™ "M"™ Normalmente il tappo a contatto con lo strato di carta è apirogeno.
- Provette da saggio apirogene, di capacità adeguata per contenere ed effettuare le diluizioni dell'endossina standard o dei campioni da esaminare (le provette di vetro da 18 x 150 mm con chiusura in acciaio inossidabile Morston sono riutilizzabili e convenienti). Vedere la sezione "Raccolta e preparazione dei campioni" per altre informazioni sui altri contenitori.
- Stufe ad aria calda da 250°C per la depirogenazione degli articoli di vetro. Nell'uso comune, le temperature indicative di tempo e temperatura sono 30 minuti a 250°C/2, 11 h.

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. **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 raddoppio in modo tale che includa la sensibilità (λ) del Pyrotell. Il contenuto di ciascuna diluizione deve essere almeno il doppio del precedente. Il contenuto di ciascuna diluizione deve essere almeno il doppio del precedente. Il contenuto di ciascuna diluizione deve essere almeno il doppio del precedente. Il contenuto di ciascuna diluizione deve essere almeno il doppio del precedente.

2. **Controlli positivi** del prodotto. Sono controlli di inibizione e sono costituiti dai campioni di diluizione di endotossina standard. La concentrazione di endotossina standard, La concentrazione di endotossina aggiunta al campione deve essere 2x.

Controlli negativi

I controlli o i controlli negativi (acqua per LAL o LRW) devono essere inclusi nel test assieme a ciascuno dei controlli positivi. Essi sono utilizzati per controllare il contenuto del test di inibizione/attivazione (1,2) anche il campione usato per diluire l'endossina 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/respiro) o per eseguire un test esaminando una serie di concentrazioni (esempi dei test di esami) sono incluse nella sezione "Risultati ed interpretazione". Si possono preparare le diluizioni del campione alle diverse fasi dell'intero ciclo della reazione, e cioè: 1) tuttavia in grado di descrivere minuziosamente l'ultimo passaggio. La proteina coagulante (coagulogeno) viene scissa dall'enzima coagulante attivato e i prodotti insolubili della scissione si uniscono mediante una interazione ionica, ad formare la matrice del gel. Ulteriori informazioni sul LAL, test e sulle relative applicazioni sono disponibili in letteratura (7,8,9).

Esecuzione del test
Per ottenere dei risultati soddisfacenti occorre adottare una tecnica adeguata.

- Aggiungere il campione al Pyrotell ricostituito. Aggiungere 0,1 ml di campione o di risultato. Utilizzare una pipetta graduata (con incrementi di 0,1 ml) oppure un pipetteatore automatico oppure a ripetizione. Inizialmente, aggiungere il Pyrotell ai controlli negativi tamponato poi dalle concentrazioni più basse a quelle più alte in ciascuna serie di esami in cui i risultati potrebbero presentare un problema. Si raccomanda l'uso di una pipetta a puntale nuovo per prevenire ogni volta dalla fiala Pyrotell. Agitare vigorosamente il campione 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 volta che il campione è stato mescolato, il risultato possono essere risultati insoddisfacenti.
- 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 finché la miscela non raggiunga 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 si forma durante l'incubazione può essere influenzata se le provette venissero maneggiate, agitate o subissero vibrazioni. Non usare bagnomaria con agitazione dell'acqua o altri sorgenti di vibrazione. Immergere le provette in acqua a superare il livello della miscela reagente, ma non inserirle troppo in profondità onde evitare di causare il galleggiamento o lo spostamento all'interno della provetta.
- Togliere, ad una ad una, le provette da saggio, leggendo i risultati individualmente. Non scuotere le provette mediante strofinamento, né scontrarle contro il lato del supporto durante l'rimozione. Invertire la provetta con un movimento uniforme; non fermarsi a metà via durante l'inversione, a meno che non si debba formare il prodotto. Il risultato positivo dell'esame viene indicato dalla formazione di un gel che non coagula quando la provetta viene invertita.

Risultati ed interpretazione

Esempio di una serie di concentrazioni standard dell'endotossina
Per determinare la sensibilità del Pyrotell e qualificare il laboratorio oppure il tecnico eseguendo l'esame LAL, si usa una serie consecutiva di concentrazioni di endotossina standard (1,2) che include la sensibilità indicata sull'etichetta (ad esempio: 2x, λ , 0,5x, 0,25x). Per questo esempio la sensibilità (λ) del campione è di 0,25 EU/ml.

Concentrazione di endotossina	Risultato della prova
0,25 EU/ml (2x)	+
0,5 EU/ml (λ)	+
1,25 EU/ml (0,5x)	+
0,6 EU/ml (0,25x)	-

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 a 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, per essere più precisi, il risultato positivo del Pyrotell. Se il risultato positivo è inferiore a quello del lotto, il risultato positivo dell'esame viene indicato dalla formazione di un gel che non coagula quando la provetta viene invertita.

Il risultato positivo dell'esame viene indicato dalla formazione di un gel che non coagula quando la provetta viene invertita.

Calcolo della sensibilità
GM = antilogaritmo (ΣZ) / n
dove Σ = somma dei logaritmi degli endpoint e n = numero degli endpoint replicati.

Il controllo negativo (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 precipitati 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 è 2x la concentrazione endotossinica di 0,25 EU/ml, nel "Esempio suddetto". Se il risultato positivo di un campione è inferiore alla sensibilità di riferimento 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'endossina ha perduto la potenza (spiega in causa dell'assorbimento sulla superficie dei contenitori) oppure l'esame non è stato condotto in modo adeguato.

Esempio di un saggio limite (accettato/respiro)
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,

$$3 \text{ EU/mg} / (1 \text{ mg/ml}) = 3 \text{ EU/ml.}$$

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 (respiro), ≥ 3 EU/ml, dividendo il limite dell'endotossina misurato in EU/ml, per la sensibilità del LAL:

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

Miscelare una parte di campione con 11 parti di LRW allo scopo di raggiungere una diluizione 1:12 e quindi effettuare il test. Il risultato indicherà che 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 e fine di eliminare i risultati falsi negativi.

Esempio di un'analisi effettuata su un campione

L'endossina 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) ed il risultato indicato nella tabella vengono testate: λ è il valore 0,25 EU/ml. I risultati vengono indicati con il simbolo positivo (più) o negativo.

Diluizione del campione	Risultato del test
non diluito (al quale)	+
1 : 2	+
1 : 4	+
1 : 8	+
1 : 16	-
1 : 32	-

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

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

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

Occorre preparare un controllo positivo del prodotto (campione miscelato con endotossina standard) 2x che risulti positivo al LAL test per eliminare i risultati falsi negativi. Se il controllo positivo contenente endotossina standard (CSE) non viene fornito con il Pyrotell, 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 Pyrotell. 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 soddisfare i same dei pirigeni per la Farm