

Beschränkungen des Verfahrens
Das Verfahren wird durch die Fähigkeit von Testproben beschränkt, hemmend oder verstärkend zu wirken. Wenn das Verfahren nicht validiert werden kann, weil die Endotoxinkonzentration einer Probe oberhalb der minimal zulässigen Konzentration (MZK) (1, 2, 3) liegt, kann der LAL-Test nicht als Ersatz für den kininähnlich-freigelegte eingesetzt werden. Die MZK wird folgendermaßen berechnet:

MZK =	(Δ) (Dosis pro Kg Körpergewicht) <p>Endotoxin-Toleranzgrenze</p>
-------	--

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

Die maximal zulässige Verdünnung (MDV) ist die Verdünnung der Probe, die die MZK enthält (1). Dies ist die Ausgangskonzentration der Probe, nachdem dieser die MZK.

Die Endotoxin-Toleranzgrenze (1) beträgt 0,2 EU/Kg für Aztreimittel, die intratrachal verabreicht werden, und 5 EU/Kg für alle anderen Parenterals. Der Grenzwert für Medizinprodukte wird pro ml Extraktionsflüssigkeit oder Spülvolumen angegeben. Die Endotoxin-Toleranzgrenze (1) beträgt 0,2 EU/Kg für alle anderen Produkte bereit der Grenzwert 0,5 EU/Kg. Der Grenzwert für flüssige Medizinprodukte ist identisch mit dem für Aztreimittel.

Typisch veranschaulicht folgende Ergebnisse, es ist dem, es wird vor dem Gebrauch durch Flüssigbehandlung desautiriert. Stoffe wie Blut, Serum, Albumin und Plasma können bei turbidimetrischen Tests hemmend wirken.

Erwartete Werte

Endotoxin in Proben kann innerhalb des Bereichs der Standard-Endotoxin-Konzentrationen, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet werden, quantifiziert werden. Wenn eine Verdünnung der Probe erforderlich wird, um Hemmung oder Verstärkung auszuschalten, wird die Mindestmenge des nachweisenden Endotoxins entsprechend erhöht. Von biologischen Quellen hergestellte Stoffe können selbst nach biochemischer Reinigung mehrere Endotoxinmengen enthalten. Wasser, das mit Hilfe von Destillation, Umkehrosmose oder Ultrafiltration gewonnen wurde, enthält, solange der Reinigungsvorgang ordnungsgemäß funktioniert und das Wasser nach der Herstellung nicht kontaminiert wird, u.U. weniger Endotoxin als nachweisbar.

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.
- Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biological Products. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, 15. Juli 1991.
- Bacterial Endotoxins Test, USP 26 NF 21.2003.
- Howell, W. H. 1985. 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.
- 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. J. Harrison. 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:730-731.
- Sweet, B. H. und J. F. Hussoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
- 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.

Unter erfahrenen Mitarbeitern besprechen gene mit ihnen die praktischen und theoretischen Aspekte des LAL-Tests. Bitte, rufen Sie an, wenn bei der Benutzung von PyroTol-T 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™-T

per il rilevamento e la quantificazione di endotossine batteriche Gram-negativa (lipopolisaccaridi)

Il saggio del lisato di amebociti di *Limulus* (LAL), qualora utilizzato in conformità con le direttive (1, 2) della Food and Drug Administration (FDA) statunitense, può sostituire il saggio dei fibrinogeni (teste delle febbre dei conigli), riconosciuto dalla Farmacopea Statunitense (USP), per testare prodotti finiti quali i "farmaci iniettabili" nel "uomo (includi i prodotti biologici), farmaci iniettabili negli animali" o "prodotti medici". Il LAL test viene raccomandato per verificare la presenza di endotossine nelle materie prime utilizzate in produzione, inclusa l'acqua, e per monitorare i livelli delle endotossine in processo. (Esame delle endotossine batteriche (3) 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* (LAL) è un estratto acquoso proveniente dalle cellule sanguigne (amebociti) del "granchio a fiore di cavallo", *Limulus polyphemus*. In presenza dell'endotossina, il componente LAL diventa torbido, e in circostanze adeguate, è in grado di formare una precipitazione solida. Il LAL test turbidimetrico viene eseguito aggiungendo un dato volume di PyroToll™ ad un determinato volume di campione, dopo che la miscela reagente viene incubata ad una temperatura di 37°C. Più elevata è la concentrazione di endotossina nel campione, più rapidamente si forma la torbidità. Attraverso la torbidità è possibile quantificare in due diversi modi la concentrazione di endotossina.

Con il metodo turbidimetrico si determina il tasso di aumento della torbidità oppure il tempo necessario per raggiungere un particolare livello di torbidità ("tempo di inizio"). Concentrazioni maggiori di endotossina riducono i "tempi di inizio". La prova necessaria di strumentazione specializzata per poter includere campioni multipli ad una temperatura controllata (in genere di 37°C) e per ottenere lettura della densità ottica ad intervalli regolari. Le curve standard, costruite tracciando il logaritmo del "tempo di inizio" in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina standard, sono utilizzate per calcolare le concentrazioni di endotossina nei campioni.

Il metodo LAL turbidimetrico è rapido, semplice, facile da eseguire nonché altamente sensibile. Il limite di rilevamento, che dipende dal modo e dalla strumentazione utilizzati, potrebbe avere un valore piccolo fino a 0,001 unità endotossiniche (Endotoin Units o EU) per mL.

Storia e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1883 (4). Negli anni cinquanta, presso il laboratorio biochimico di Woods Hole, Massachusetts, Bang scoprì che i batteri Gram -negativi provocano la coagulazione del sangue di *Limulus* (5). Levin e Bang determinarono in seguito che la reazione è di tipo enzimatico e che gli enzimi sono situati nei granuli degli amebociti (6). Dimostrarono che la coagulazione viene iniziata da un componente strutturale unico, presente nella parete della cellula batterica: l'Endotossina o lipopolisaccaride (7). Oggi si ritiene che la formazione della coagulazione sia il risultato di innumerevoli passaggi di attivazione degli enzimi. Nonostante non si conosca l'intero ciclo della reazione, si è tentata 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 e la torbidità della miscela di reazione. Più è alta la presenza di endotossina, più rapidamente si sviluppa la torbidità. Ulteriori informazioni sul LAL test e sulle relative applicazioni sono disponibili in letteratura (8, 9, 10).

Reagenti

Il PyroToll™ viene confezionato in forma liofilizzata. Il PyroToll™ contiene un estratto acquoso di amebociti di *L. polyphemus*, albumina sierica umana (stabilizzatori), NaCl ed altri sali adeguati. Non sono stati aggiunti conservanti o tamponi. Il PyroToll™ non è elichettato con una specifica sensibilità. La sensibilità in un dato test (designata con Δ) è la concentrazione più bassa di endotossina utilizzata per costruire la curva standard. Nel sistema di rilevamento automatico dell'endotossina Pyros Kinetics è LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.). Il limite di rilevamento è dunque il valore più basso possibile, Δ è di 0,001 EU/ml.

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

Ricostruzione del PyroToll™

1. Togliere con cura la guarnizione metallica della vial di PyroToll™ accertandosi che il contenuto sia sul fondo. Eliminare il vuoto sollevando il tappo in gomma grigio senza contaminare l'imboccatura della vial. Rimuovere il tappo e non riutilizzare per chiudere la vial. Un piccolo quantitativo di liquido rimasto adeso al tappo non influenzerà il risultato. Non tutti i contenitori di plastica sono privi di endotossina e alcune sostanze possono formare interferendo con il LAL test. Il materiale da laboratorio può essere testato selezionando a caso alcuni contenitori ad un lotto, sciacquarli con un piccolo volume di LRW a temperatura ambiente per un'ora e testando l'acqua di risciacquo come se fosse un campione. Il risciacquo deve contenere un quantitativo di endotossina significativamente inferiore a quella utilizzata come standard più basso. Inoltre, il risciacquo non deve né inibire né attivare il test. Il contenuto di endotossina deve essere inferiore a quello dello standard.
2. Il pH della miscela di reazione (4 volumi di campione o diluizione del campione mescolato con 1 volume di PyroToll™ o rapporto usato nel protocollo) deve essere 6 a 6,8. Aggiustare il pH del campione con HCl, NaOH o tampone (essente da endotossine). Diluire HCl o NaOH con LRW e utilizzarli ad una normalità che non porti ad una significativa diluizione del campione. Se si forma un precipitato nella vial dopo l'aggiustamento del pH, diluire il campione (senza eccedere la MVD-vedere "Limiti della Procedura") prima di aggiustare il pH. In alternativa, ricostruire il PyroToll™ con tampone compatibile disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc. e raggungere il pH della miscela di reazione. Non aggiustare il pH di soluzioni non tamponate o acqua.
Notare che la diluizione da sola può superare i problemi di pH.
3. Sostanze che desaturano le proteine, chelano gli ioni, legano le endotossine o alterano lo stato idrofobico delle endotossine possono interferire con il test. L'interferenza può essere rilevata quantificando il recupero di maggior o minor endotossina rispetto all'atesso quando una quantità nota di endotossina standard viene aggiunta al campione. In molti casi la diluizione del campione ridurrà la concentrazione e l'attività di sostanze interferenti e porterà a risultati dei test validi. Un appropriato schema di controllo e diluizione è descritto nel paragrafo "Procedura del Test".

I campioni devono essere testati il prima possibile dopo la raccolta. Può essere opportuno congelare i campioni che devono essere stoccati o spediti prima di eseguire il test. Campioni di cui ci si aspetta un basso quantitativo di endotossina (meno di 1 EU/mL) devono essere testati per la perdita di endotossina durante lo stoccaggio.
Protocollo operativo
Raccolta e preparazione dei campioni
I campioni devono essere raccolti in contenitori aprotamici. Il riutilizzo di vetreria deiprogenata o plastica di poliestere sterile è monosono sono consigliate per ridurre l'assorbimento dell'endotossina sulla superficie dei contenitori. Non tutti i contenitori di plastica sono privi di endotossina e alcune sostanze possono formare interferendo con il LAL test. Il materiale da laboratorio può essere testato selezionando a caso alcuni contenitori ad un lotto, sciacquarli con un piccolo volume di LRW a temperatura ambiente per un'ora e testando l'acqua di risciacquo come se fosse un campione. Il risciacquo deve contenere un quantitativo di endotossina significativamente inferiore a quella utilizzata come standard più basso. Inoltre, il risciacquo non deve né inibire né attivare il test. Il contenuto di endotossina deve essere inferiore a quello dello standard.
2. Il pH della miscela di reazione (4 volumi di campione o diluizione del campione mescolato con 1 volume di PyroToll™ o rapporto usato nel protocollo) deve essere 6 a 6,8. Aggiustare il pH del campione con HCl, NaOH o tampone (essente da endotossine). Diluire HCl o NaOH con LRW e utilizzarli ad una normalità che non porti ad una significativa diluizione del campione. Se si forma un precipitato nella vial dopo l'aggiustamento del pH, diluire il campione (senza eccedere la MVD-vedere "Limiti della Procedura") prima di aggiustare il pH. In alternativa, ricostruire il PyroToll™ con tampone compatibile disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc. e raggungere il pH della miscela di reazione. Non aggiustare il pH di soluzioni non tamponate o acqua.
Notare che la diluizione da sola può superare i problemi di pH.
3. Sostanze che desaturano le proteine, chelano gli ioni, legano le endotossine o alterano lo stato idrofobico delle endotossine possono interferire con il test. L'interferenza può essere rilevata quantificando il recupero di maggior o minor endotossina rispetto all'atesso quando una quantità nota di endotossina standard viene aggiunta al campione. In molti casi la diluizione del campione ridurrà la concentrazione e l'attività di sostanze interferenti e porterà a risultati dei test validi. Un appropriato schema di controllo e diluizione è descritto nel paragrafo "Procedura del Test".
Calcoli preliminari
Determinare il tempo necessario ai campioni per raggiungere una particolare soglia di densità ottica (in genere 0,02 unità OD in un lettore per processi; 0,03-0,1 unità OD in un lettore per micropiastre) dopo aver effettuato eventuali correzioni dei dati. Le letture della densità ottica devono essere corrette ad una lettura iniziale stabilibile al valore 0 (zero) unità OD. Diversi dati saranno eseguiti dai software. Il tempo necessario per raggiungere il valore OD viene chiamato "tempo di inizio".
Costruzione di una curva standard.
Se deve costruire una curva standard con la regressione del logaritmo del "tempo di inizio" in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina per gli standard. Questo passaggio viene eseguito dal software. L'equazione della linea di regressione descrive la curva standard.
Calcolo delle concentrazioni di endotossina.
Questo passaggio viene eseguito dal software. L'equazione della linea di regressione descrive la curva standard.
Calcolo delle concentrazioni di endotossina.
Calcolare le concentrazioni di endotossina di tutti i campioni (includi gli standard ed i controlli) utilizzando l'equazione di una linea retta:
Y = aX + b
dove:
Y = logaritmo del "tempo di inizio"
X = logaritmo della concentrazione di endotossina
a = coefficiente della linea
b = intersezione sull'asse Y.
Questo calcolo viene effettuato dal software.

Risultati

- Calcoli preliminari.** Determinare il tempo necessario ai campioni per raggiungere una particolare soglia di densità ottica (in genere 0,02 unità OD in un lettore per processi; 0,03-0,1 unità OD in un lettore per micropiastre) dopo aver effettuato eventuali correzioni dei dati. Le letture della densità ottica devono essere corrette ad una lettura iniziale stabilibile al valore 0 (zero) unità OD. Diversi dati saranno eseguiti dai software. Il tempo necessario per raggiungere il valore OD viene chiamato "tempo di inizio".
Costruzione di una curva standard.
Se deve costruire una curva standard con la regressione del logaritmo del "tempo di inizio" in funzione del logaritmo della concentrazione di endotossina per gli standard. Questo passaggio viene eseguito dal software. L'equazione della linea di regressione descrive la curva standard.
Calcolo delle concentrazioni di endotossina.
Calcolare le concentrazioni di endotossina di tutti i campioni (includi gli standard ed i controlli) utilizzando l'equazione di una linea retta:
Y = aX + b
dove:
Y = logaritmo del "tempo di inizio"
X = logaritmo della concentrazione di endotossina
a = coefficiente della linea
b = intersezione sull'asse Y.
Questo calcolo viene effettuato dal software.

Interpretazione

- Affinché un esame sia valido, la concentrazione di endotossina dei controlli negativi (valutata dall'extrapolazione della curva standard) deve essere considerevolmente inferiore a quella della concentrazione standard più bassa.
2. Quando una curva standard viene inclusa in un test, il valore assoluto del coefficiente di correlazione della curva standard deve essere superiore o uguale a 0,980.
3. La concentrazione media di endotossina misurata nei controlli positivi deve essere compresa fra il 25% della concentrazione nominale. Perciò, se il controllo positivo di 0,125 EU/mL, la concentrazione misurata deve essere compresa fra 0,09375 e 0,15625 EU/mL.
4. Se la concentrazione di endotossina misurata in un campione di inizio per la curva standard. Per esempio, se i "tempi di inizio" di due duplicati della concentrazione di endotossina standard più alta sono 1079 e 1087 secondi e quelli per la concentrazione più bassa sono 1954 e 1968, la gamma media dei "tempi di inizio" è 1083-1961. Le concentrazioni valide di endotossina possono essere calcolate solo per i campioni con un "tempo di inizio" medio rientrante nella gamma media dei "tempi di inizio" della curva standard.
Ad esempio, un risultato valido può essere fornito per un'incognita che riporta "tempi di inizio" di 1949 e 1965 (minimo = 1957), e prescindere dal fatto che uno dei duplicati cada al di fuori della gamma standard.
5. Al fine di dimostrare che i campioni analizzati non interferiscono in modo significativo con la reazione LAL/endotossina, la concentrazione finale di endotossina misurata nei controlli "positivi" di prodotto, deve essere compresa tra il 50% ed il 200% della concentrazione nominale di endotossina aggiunta, altrimenti detta "spike". Prima di determinare che il ritrovamento dello spike è verificato o meno all'interno di tali limiti, bisogna sempre sempre la concentrazione di endotossina che viene misurata nel campione non addizionato di spike. Ad esempio, in modo da essere considerata libera da interferenze significative, la concentrazione misurata di endotossina in un controllo positivo di prodotto di 0,125 EU/mL (dopo sottrazione di tutta l'endotossina del campione non addizionato di spike), deve essere compresa nel rango 0,0625-0,25 EU/mL (ossia il range che va dal 50% al 200% di 0,125 EU/mL). Se la concentrazione misurata di endotossina in un campione è di 0,028 EU/mL, o quella misurata nel controllo positivo dello stesso campione 0,163, l'endotossina attribuibile allo spike è 0,163 - 0,028 = 0,135 EU/mL. Tale valore è compreso nei limiti consentiti ed è soggetto anche alle altre condizioni richieste; il test è pertanto valido.

Limiti della procedura

La procedura viene limitata dalla capacità di inibizione o attivazione del campione al momento del test. Se la procedura non può essere utilizzata per un campione, il risultato è "Limite di tolleranza". La massima diluizione valida (MDV) è la diluizione del campione che rientra nella Minima Concentrazione Valida (1). E' la concentrazione iniziale del campione divisa per la MCV.

Il limite di tolleranza endotossinica (1) è di 0,2 EU/Kg per i farmaci somministrati per via intratecale e di 0,5 EU/Kg per tutti gli altri casi somministrati per via parenterale. Il limite per i "prodotti 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 triptina causa risultati falsi positivi a meno che non sia desaturata mediante trattamento a caldo prima di effettuare il test. Materiali quali sangue, siero, albumina e plasma possono interferire con le prove turbidimetriche.

Valori medi

L'endotossina presente nei campioni può essere quantificata solo quando la gamma delle concentrazioni endotossiniche standard utilizzata per costruire la curva standard. Se fosse necessario diluire il campione al fine di superare qualsiasi inibizione oppure attivazione, la quantità minima di endotossina che può essere rilevata verrebbe aumentata in modo corrispondente. I materiali che provengono da sorgenti biologiche, anche dopo essere state sottoposte a purificazione biochimica, potrebbero ancora contenere livelli misurabili di endotossina. L'acqua, ottenuta mediante distillazione, osmosi inversa oppure ultra-filtrazione, potrebbe contenere quantità misuri di endotossina di cui la percentuale finche il processo di purificazione funziona in modo corretto e l'acqua non viene contaminata dopo la produzione.

- 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.
- Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biological Products. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, July 15, 1991.
- Bacterial Endotoxins Test, USP 26 NF 21.2003.
- Howell, W. H. 1985. 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.
- 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., e F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
- 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.
- 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.
- 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, et T. J. Novitsky (editor), Alan R. Liss, Inc., NY.
- Tsujii, K., and S. J. Harrison. 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:730-734.
- Sweet, B. H. et J. F. Hussoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
- 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.

ESPAÑOL

LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS

PYROTELL™-T

Para la Detección y Cuantificación de Endotoxinas de Bacterianas Gram Negativas (Lipopolisacáridos)

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), cuando es utilizada de acuerdo a las directivas de la Administración Alimentos y Drogas (FDA, Food and Drug Administration) (1, 2), puede reemplazar a la prueba de prígenos (prueba de fiebre de conejos) de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP U.S. Pharmacopeia), para el control de producto terminado de "farmacos inyectables para uso humano (incluyendo productos biológicos), fármacos 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 la presencia de endotossina en el producto. 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* (LAL) es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) de cangrejo herradura *Limulus polyphemus*. En presencia de endotoxina, el LAL se enturbia y, a una determinadas condiciones coagula formando un gel sólido. El ensayo LAL turbidimétrico se realiza añadiendo un volumen determinado de PyroToll™ a otro determinado volumen de muestra e incubando la mezcla de reacción a 37°C. Cuanta mayor es la concentración de endotoxina en la muestra, más rápida se desarrollará la turbididez. Existen dos formas de cuantificar la concentración de endotoxina.

En el método turbidimétrico clínico LAL, se determina el o grado de incremento de turbidez o el tiempo que se tarda en alcanzar un nivel determinado de ésta (tempo de activación). Cuanto más alta sean las concentraciones de endotossina, menor será el tiempo de activación. El ensayo requiere instrumental especializado para incluir varias muestras a temperatura controlada (normalmente 37°C) y tomar lecturas ópticas de la densidad óptica a intervalos regulares. Las curvas estándar pueden construirse representando el logaritmo del tiempo de activación frente del logaritmo de la concentración de endotossina estándar y se utilizan para calcular las concentraciones de endotossina de las muestras.

El método turbidimétrico LAL es rápido, específico, fácil de manejar y altamente sensible. El límite de detección depende del modo y de los instrumentos empleados y puede ser tanto como 0,001 Unidades Endotossina (EU) por ml.

Historia y Principio Biológico

Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1883 (4). En los años 1950's, en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, Bang descubrió que las bacterias Gram negativas causan la coagulación de la sangre de *Limulus* (5). Levin y Bang determinaron más tarde que la reacción es enzimática y que las enzimas están localizadas dentro de los granulos de los amebocitos (6). Demostraron que la coagulación es iniciada por un componente estructural único de la pared celular bacteriana denominado endotossina o lipopolisacárido (7). La comprensión actual es que la reacción que lleva a la formación del coágulo es una cascada de pasos de activación, en la que la reacción completa no ha sido totalmente comprendida, el último paso ha sido bien descrito. La proteína de coagulación (coagulogeno) se escinde en la enzima de coagulación activada; los productos de desdoblamiento son insolubles y se unen mediante interacción iónica incrementando la turbidez de la muestra. Cuanta mayor presencia de endotossina, mayor es el desarrollo de turbidez. Mas información sobre la reacción del LAL y sus aplicaciones pueden encontrarse en la literatura (8, 9, 10).

Reactivo

PyroToll™ se presenta en forma liofilizada. PyroToll™ contiene el extracto acuoso de amebocitos de *L. polyphemus*, albumina sérica humana (estabilizadores), NaCl ed otros sales apropiadas. No se conservan tampones ni conservantes.

PyroToll™ no viene marcado con una sensibilidad específica. La sensibilidad en un ensayo determinado (designada como Δ) es la menor concentración de endotossina utilizada para construir la curva estándar. En los Sistemas Automáticos de Detección de Endotoxinas Pyros Kinetics y LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), el límite de detección es menor y, por ello, el menor valor posible de Δ es 0,001 EU/ml.

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

Reconstrucción del PyroToll™

- Golpee ligeramente el vial de PyroToll™ para que el LAL suelto se deposite en el fondo. Levante el tapón gris para romper el sello. No contamine la boca del vial. Retire y deseche el tapón; no inyecte a través de él o vuelva a utilizar la. La prueba no se verá afectada si queda una pequeña cantidad de LAL en el tapón.
2. Reconstruir el PyroToll™ (LAL, LRW, LRW Reagent Water - vesee más abajo) ó con un tampón compatible de Associates of Cape Cod, Inc. No rehidratar hasta inmediatamente antes de utilizar. Añadir 5 mL según se indica en la etiqueta del vial. El contenido de LAL se disolverá en pocos minutos. Antes de utilizar, voltear cuidadosamente el vial para asegurar su homogeneidad. Agitar vigorosamente puede ocasionar la formación de espuma lo que a su vez puede ocasionar una pérdida de sensibilidad. Cubrir el vial con Parafilm M® (American National Can™) cuando no está en uso.
Calculos preliminares.
Determinar el tiempo requerido por las muestras para alcanzar un determinado nivel de densidad óptica (normalmente 0,02 unidades de DO en un lector de tubos; 0,03 -0,1 unidades de DO en el lector microplaca) después que se hayan realizado las correcciones pertinentes de los resultados. Las lecturas de la densidad óptica deben realizarse en relación a una lectura inicial a la que se asigna un valor de 0 unidades de DO. El programa lo calculará automáticamente. El tiempo necesario para alcanzar el valor de DO se denomina tiempo de activación (onset time).
Construcción de la curva estándar.
Construir una curva estándar mediante la regresión del logaritmo del tiempo de activación frente al logaritmo de las concentraciones estándar de endotossina. El programa realizará este cálculo. La ecuación de la recta de regresión describe la curva estándar.
Cálculo de las concentraciones de endotossina.
Calcular las concentraciones de endotossina de todas las muestras (incluyendo los controles estándares) utilizando la ecuación lineal de la recta:
Y = aX + b

- Pipetas*, pipetas automáticas con puntas de pipeta (tips) adecuadas ó pipetas de repetición con jeringas de plástico. Se recomienda el uso de pipetas y puntas de pipeta desechables y libres de factores de interferencia como endotoxinas y glucosidos de Associates of Cape Cod, Inc. afecte la línea "Procear". La cual viene provista con Certificado de Cumplimiento, certificado que los productos están libres de endotoxinas y glucosos de interferencia.
Mezclador del tipo "vortex."
Purifilm™ 7™. Parte en contacto con el papel es, por lo general, no pirógeno.
7. **Tubo de suero** para proporcionar una capacidad adecuada para realizar diluciones estándar de endotossina o muestras. Ver "Colección y Preparación de Muestras" para otros requisitos aptos para realizar diluciones.
8. **Horno de aire seco** que alcance una temperatura de 250°C, para la desiprogenización de artículos de vidrio. Normalmente se establece un tiempo de 30 minutos a temperatura de 250°C (3, 12).

Controles

Los controles son necesarios para asegurarse de la validez de la prueba. La FDA (1,2) y la USP (3) detallan los procedimientos recomendados.

- Controles negativos**
a. Serie de endotossina estándar. Preparar cada día una nueva serie de diluciones a partir de la endotossina concentrada. No utilice soluciones previamente preparadas a menos que haya demostrado la estabilidad de la prueba de las mismas. Preparar las diluciones según una serie geométrica (por ejemplo, diluciones dobles, cuádruples, o decuples) para obtener el rango de concentraciones de endotossina requeridas. Se recomienda utilizar concentraciones de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0,03125 UE/mL para comprobar la sensibilidad del PyroToll™. La mínima concentración de endotossina en cualquier serie estándar es el límite de detección de ese ensayo particular y se designa como Δ. Para alcanzar el rango de volúmenes requerido, utilice el menor número posible de diluciones con los volúmenes adecuados. Añadir estas volúmenes con una pipeta a fin de lograr la mayor exactitud posible.
b. Controles positivos
1. Controles positivos de endotossina estándar (la serie estándar (véase el apartado a. anterior) no se prepara de la misma forma que los controles positivos del producto (véase el apartado c.). Una concentración Δ es adecuada para curvas estándares controladas a partir de 4, 5 ó 6 ó concentraciones dobles de endotossina estándar (por ejemplo, 4Δ, 0,125 UE/mL en la serie estándar mencionada en la sección a. anterior). En las ensayaciones con el método de incremento de diluciones mayor que el doble, la concentración de control positivo correspondiente a la del punto medio de las concentraciones de la curva estándar. Por ejemplo, una concentración de 0,1 EU/ml serie adecuada para una serie estándar que comprenda las siguientes concentraciones: 0,001, 0,01, 0,1 y 1,0 EU/mL. Si con la prueba no se incluye una serie estándar, es necesario incluir un control positivo para comprobar que se manejan los volúmenes de muestra de acuerdo a los tiempos de activación de las curvas estándares de endotossina. Consulte la Directiva de la FDA (1) y la Guía Provisional (Interim Guidance) (2) bajo "Prueba sistemática de fármacos (o dispositivos) mediante la prueba LAL" para más detalles.
c. Controles positivos del producto
son controles de inhibición/potenciación de la muestra o la dilución de la muestra a que se añade la endotossina estándar. La concentración de la endotossina añadida en la muestra que se usa para hacer la curva estándar anterior para calibrar las concentraciones de endotossina. Consulte la Directiva de la FDA (1) y la Guía Provisional (Interim Guidance) (2) bajo "Prueba sistemática de fármacos (o dispositivos) mediante la prueba LAL" para más detalles.
d. Controles negativos
de la muestra de control positivo del producto. La endotossina añadida a menudo se denomina "spike". Con cada prueba deben incluirse controles negativos de LRW.

Preparación de Muestras – Determinación de la Dilución de Trabajo

Si previamente se ha desarrollado un protocolo de trabajo para el tipo de muestra a ensayar, preparar el diluente necesario e ensayo y proceda según se indica en la sección "Realización de la prueba". Si no se ha desarrollado un protocolo para dicho tipo de muestra, preparar una serie de diluciones decuplas. No sobrepase la Máxima Dilución Válida (MDV) del producto en más de un factor de 10. (Vea la sección sobre "Limitaciones del procedimiento" a continuación o la Directiva de la FDA (1) para una explicación y cálculo de la MDV y de la Minima Concentración Válida (MCV).)

Preparar diluciones adecuadas para todas las muestras utilizando un control positivo de producto para cada una de ellas.

Realización del Ensayo

Para obtener unos resultados satisfactorios es necesario utilizar una **técnica consistente**. Todos los controles y muestras deben ensayarse como muestra de control positivo por duplicado.

- Preparar todo el material necesario. En los sistemas automáticos, usualmente, conlleva entrar los descriptores de las muestras además de establecer de los parámetros para el ensayo de éstas.
2. Añadir el volumen apropiado de muestra (control negativo, endotossina estándar, muestra, control positivo) ó control positivo a un tubo de reacción ó tubo de reacción ó microplaca. Para una relación 1:1 en el Pyros Kinetics, utilizar 0,1 mL de la muestra de 1:4 en el volumen de muestra, se utiliza un volumen de 0,2 mL ó 0,4 mL, en el sistema LAL-5000, el volumen apropiado es 0,4 mL, y en una microplaca de incubación el volumen apropiado es de 0,1 mL.
3. Añadir PyroToll™ según el procedimiento que se utilice.
a. Para obtener los resultados del ensayo, el tiempo de reacción en cada uno de ellos es crítico. A cada tubo de reacción, por turno, añadir el PyroToll™ agitar unos 2 segundos y colocarlo en el incubador-lector óptico. El volumen de PyroToll™ a añadir en el sistema LAL-5000 es de 0,1 mL, 0,1 mL, para las microplacas de incubación y 0,1 mL para la relación 1:1 del Pyros Kinetics y en la mayoría de los otros

LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE

PYROTELL-T For The Detection And Quantification Of Gram Negative Bacterial Endotoxins (Lipopolysaccharides)

The *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test, when used according to U.S. Food and Drug Administration (FDA) guidelines (1, 2), may be substituted for the U.S. Pharmacopoeia (USP) Pyrogen Test (rabbit fever test) for the end-product testing of "human injectables," animal biological products, and medical devices. The LAL test is recommended for the detection and quantification of endotoxin in raw materials used in production, including water, and for in-process monitoring of endotoxins. The USP Bacterial Endotoxins Test (3) is the official test referenced in specific USP monographs.

Summary of Test

Limulus amoebocyte lysate (LAL) is an aqueous extract of blood cells (amoebocytes) from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. In the presence of endotoxin LAL becomes turbid and, under appropriate conditions, forms a solid gel-clot. The turbidimetric LAL test is performed by adding a given volume of Pyrorell-T to a given volume of specimen and incubating the reaction at 37°C. The higher the endotoxin concentration in the specimen, the faster turbidity will develop. Turbidity can be used to quantify endotoxin concentration in two ways.

In the kinetic turbidimetric LAL method, either the rate of increase in turbidity or the time taken to reach a particular level of turbidity (the onset time) is determined. Higher endotoxin concentrations give shorter onset times. The assay requires special instrumentation to incubate multiple samples at a controlled temperature (usually 37°C) and take optical density readings at regular intervals. Standard curves relating the log onset time against the log concentration of standard endotoxins are used to calculate endotoxin concentrations in specimens.

The turbidimetric LAL method is rapid, specific, easy to perform, and highly sensitive. The detection limit depends on the method and instrumentation used and may be as low as 0.001 Endotoxin Units (EU) per mL.

History and Biologic Principle

Howell described the clotting of *Limulus* blood in 1885 (4). In the 1950s, Bang at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, discovered that gram negative bacteria cause *Limulus* blood to clot (5). Levin and Bang later determined that the reaction is enzymatic and that the enzymes are located in the amoebocytes (6). They showed that clotting is initiated by a unique structural component of the bacterial cell wall called endotoxin or lipopolysaccharide (7). Current understanding is that the reaction consists of 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 product, called the clotting enzyme, causes the reaction to increase. The greater the amount of clotting enzyme, the faster endotoxin present, the faster turbidity develops. More information about the LAL reaction and applications is available in the literature (8, 9, 10).

Pyrorell-T is packaged in lyophilized form. Pyrorell-T contains an aqueous extract of amoebocytes of *L. polyphemus*, human serum albumin (stabilizer), NaCl and other appropriate ions. No preservatives or buffers are added.

Pyrorell-T is not labeled with a specific sensitivity. Sensitivity in a given test (designated A) is the lowest endotoxin concentration that will give a 9000 minute USP response. The endotoxin detection system (Associates of Cape Cod, Inc.) the detection limit, and thus the lowest possible value of A, is 0.001 EU/mL.

Use Pyrorell-T for *in vivo* diagnostic purposes only. Do not use it for the detection of endotoxins. The toxicity of this reagent has not been determined; thus, caution should be exercised when handling Pyrorell-T.

Reconstitute Pyrorell-T as follows:

- Gently tap the vial of Pyrorell-T to cause LAL to fall to the bottom. Break the vacuum by lifting the gey stopper. Do not contaminate the mouth of the vial. Remove and discard the stopper; do not inject through or reuse the stopper. Do not use the vial for any other purpose.
- Reconstitute Pyrorell-T with LAL Reagent Water (LRW; see below) or compatible buffer (available from Associates of Cape Cod, Inc.). Do not rehydrate until immediately before use. Add 5 mL, as indicated on the vial label. The LAL pellet will give you solution within a few minutes. Before use, gently swirl the vial to insure homogeneity. Mixing too vigorously may cause a foamy frothing which can cause a loss of sensitivity. Cover the vial with Parafilm M® (American National Can™) when not in use.

Storage Conditions

Freeze-dried Pyrorell-T is relatively heat stable and, if kept refrigerated, will retain full activity through the expiration date on the label. Store the product at 20° to 48°C. Temperatures below -20°C can shrink the product, leading to a possible loss of vacuum and contamination of Pyrorell-T. Temperatures in excess of 37°C can cause rapid deterioration of lyophilized Pyrorell-T. As evidenced by loss of sensitivity and a distinct yellowing of the product, Pyrorell-T is shipped with cold packs in insulated containers to protect against high temperatures.

Reconstituted Pyrorell-T is usually clear and slightly opalescent. An occasional lot may 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 Pyrorell-T for use in freeze-dried control vials can be held for up to 24 hours at 2 to 8°C. Reconstituted Pyrorell-T can be frozen once. It 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. Resused, decontaminated glassware or sterile, disposable, polystyrene containers 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. Labels are tested for acceptable buffer concentrations (see below) that show no detectable endotoxin. The use of LRW at room temperature for one hour, and testing the rinse as a specimen, the rinse should contain significantly less endotoxin than the lowest standard concentration to be used. Also, a rinse should neither inhibit nor enhance the test as determined by recovery of a known amount of added endotoxin.

The pH of the reaction mixture (4 volumes of specimen or specimen dilution mixed with 1 volume of Pyrorell-T or other ratio as in the test protocol) should be 6 to 8. Adjust the pH of the specimen to the desired pH with a buffer (free of detectable endotoxin). Dilute concentrated HCl or NaOH with LRW and use in normalities that will not lead to significant dilution of the specimen. If a precipitate forms in the sample upon pH adjustment, dilute the sample (not to exceed the MVD - see "Limitations of Procedure") before adjusting the pH. Alternatively, reconstitute the Pyrorell-T with a compatible buffer (available from Associates of Cape Cod, Inc.) and check the pH of the reaction mixture. Do not adjust the pH of unbuffered saline or water. Note that dilution alone may overcome pH problems.

Substances that denature proteins, chelate ions, 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 expected when a known amount of endotoxin is added to the reaction mixture. "Limitations of Procedure" section describes the use of a component 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 non-sterile specimens that will be stored or shipped before testing. Specimens expected to contain low concentrations of endotoxins (less than 1 EU/mL) should be tested for loss of endotoxin during storage.

Test Procedure

Test Reagents

- Pyrorell-T* (see description and method of reconstitution above).
- LAL Reagent Water* (LRW), not provided with Pyrorell-T, either separately, lyophilized Pyrorell-T, or reconstituted with LRW, is used to reconstitute Pyrorell-T. LRW is a sterile, pyrogen-free, buffered solution that shows no detectable endotoxin in the LAL test. Recommended sources for water include Associates of Cape Cod, Inc., or any commercially available USP Sterile Water for Injection (sterile WFI) without bacteriostat or USP Water for Injection. Any WFI is only used provided they have been shown to be acceptable for use as an LRW. The USP Water for Injection for USP sterile WFI is only 0.25 µg/litre, therefore, endotoxin levels are unusable for use.
- To certify that water is acceptable as an LRW, test it a specimen with a positive product control (see item 1, c, in the section on "Controls"). The certified LRW to reconstitute Pyrorell-T, to make dilutions of standards, and to prepare positive controls (see items 1, a, and 1, b, under "Controls"). Construct a standard curve from the onset times for the standards. This standard curve is used to determine the concentration of endotoxin in the sample. The water being tested can be estimated by extrapolation of the standard curve below the lowest endotoxin concentration and should be significantly less than that of the lowest standard. Also, the endotoxin concentration of the positive product control must be within 50% to 200% of the nominal concentration of the added endotoxin "spike."
- Buffer*, not provided with Pyrorell-T, order separately if required. Pyrosol Buffer (Cat# BC051 or BC554) or Glucabuffer™ (Cat# GB051) can be used instead of LRW to reconstitute Pyrorell-T to help overcome a sample pH problem or interference from glassware.
- Standard Endotoxin*, not provided with Pyrorell-T; order separately. Control Standard Endotoxin (CSE), obtained from Associates of Cape Cod, Inc., is used to construct standard curves, validate product, and prepare inhibition controls. Each vial contains a measured amount of endotoxin in a specific volume of water. The endotoxin concentration in the USP Pharmacopoeial Convention, Inc. Follow manufacturers' directions for reconstitution and storage of standard endotoxins. CSE lots may show different potencies (EU/ng) when tested with different lots of Pyrorell-T. Using CSE, endotoxin concentrations can be expressed in EU/mL if the potency of a given lot of CSE has been determined with the Pyrorell-T lot in question (2, 1).

Materials and Equipment (not provided)

- Reaction vessels.* Choice of type depends on the instrumentation used to measure turbidity. Reaction tubes for the Pyros Kinetics test require borosilicate glass tubes (TK100). The LAL-5000 system uses 10 x 75 mm, depyrogenated, borosilicate glass tubes (TB500). If Pyrorell-T is being used in a microplate reader, we recommend the use of Pyroplates™ available from Associates of Cape Cod, which are certified free of interfering endotoxins and glucans. When using other brands of microplates, be aware that some plastics interfere with the LAL reaction or adsorb endotoxin. Thus, microplates should be checked for interference with the LAL reaction.
- Optical reader.* For the kinetic turbidimetric method, use of an incubating optical reader such as the Pyros Kinetics, the LAL-5000 automatic Endotoxin Detection System, or the BioTek ELx 800 IU, available from Associates of Cape Cod, Inc. is recommended.
- Test tubes* to hold and/or incubate reaction tubes.
- Pipets,* automatic pipetters with pipet tips, or repeating pipetters with plastic syringe barrels. Disposable pipets and tips come with a Certificate of Compliance certifying that the products are free of interfering endotoxins and glucans.
- Vortex mixer.*
- Parafilm M.* The side in contact with the paper backing is normally nonpyrogenic.
- 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.
- Hot air oven* with 250°C capacity for depyrogenation of glassware. Commonly used minimum time and temperature settings are 30 minutes at 250°C to 120.

Controls

Controls are necessary to insure a valid test. Recommended procedures are detailed by the FDA (1, 2) and USP (3).

1. Endotoxin controls

a. **Endotoxin standard series.** Prepare a fresh set of dilutions from the stock endotoxin solution for each test. Do not use previously prepared dilutions unless you have demonstrated the stability of that range of concentrations. Make dilutions in geometric series (e.g. twofold, fourfold or tenfold dilutions) to give the range of endotoxin concentrations required. Concentrations of 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 EU/mL are recommended to verify Pyrorell-T performance. The lowest endotoxin concentration in any standard series is the detection limit of that particular test and is designated "L." To get to the range of standards required, use as few dilutions as possible with appropriate pipette volumes to maximize accuracy.

b. **Positive control** (a single standard endotoxin concentration should be included if the standard series (see a. above) is not prepared in the same way as the positive product controls (see c.). A concentration of 4L is appropriate for standard curves constructed from 4, 5 or 6 twofold dilutions of standard endotoxin (e.g., 4L = 0.125 EU/mL in the standard series given in section a. above). In situations where the increment of dilution is greater than twofold, the concentration of the positive control should equal that of a standard from the middle of the standard curve. For example, a value of 1.0 EU/mL would be appropriate for positive controls included with a standard series that is comprised 0.0001, 0.01, 0.1, and 1.0 EU/mL concentrations. If a standard series is not included in a test, a positive control must be included to verify that it is appropriate to use the parameters of a previous standard curve to calculate endotoxin concentrations. Refer to the FDA guideline (1) and Interim Guidance (2) under Routine Testing of Drugs (or Devices) by the LAL Test for details.

c. **Positive product controls** are inhibition/enhancement controls and consist of the specimen or dilution of specimen to which standard endotoxin is added. The concentration of added endotoxin in the test specimen should be the same as that of the positive control. See section b. above for selection of the appropriate endotoxin concentration for the positive product control. The added endotoxin is frequently referred to as a "spike."

2. Negative controls

LRW negative controls should be included with each test.

Specimen Preparation - Determination of Test Dilution
If a test protocol has been developed previously for the type of specimen under test, make the necessary dilution for the assay and proceed as directed under "Performing the Test." Below, if a protocol has not been developed for the specimen type, make a series of tenfold dilutions of the specimen. Do not exceed the Maximum Valid Dilution (MVD) of the product by more than a factor of 10. (Refer to "Limitations of Procedure" under the FDA Guidelines (1) for explanation and calculation of MVD and Minimum Valid Concentration (MVC).)

Prepare appropriate dilutions of all specimens with a positive product control for each one.

Performing the Test

Consistent technique is necessary to obtain satisfactory results. All controls and specimens should be tested in (at least) duplicate.
1. Prepare test instrumentation as necessary. In an automated system this usually involves entering sample descriptions and setting up test sample test parameters first.
2. Add the appropriate volume of sample (negative control, endotoxin standard, specimen, positive control) or positive product control) to the reaction tube or microplate. For a 1:1 ratio in the Pyros Kinetics unit, 0.1 mL for a 1:4 ratio in the Pyros Kinetics, either a 0.2 mL or 0.4 mL volume in the LAL-5000 system, the appropriate volume is 0.4 mL; and in an incubating microplate, the appropriate volume is 0.1 mL.

3. Add Pyrorell-T as appropriate for procedure.

- For methods using individual reaction tubes the timing of the reaction in each tube is critical. To each reaction tube in turn, draw 4 µl of Pyrorell-T and add it to the reaction mixture. The concentration measured does not change with time. The volume of Pyrorell-T added is 0.1 mL for the LAL-5000 system, 0.1 mL for a microplate, 0.1 mL for the 1:1 ratio method of the Pyros Kinetics, and most other methods. For the Pyros Kinetics 1:4 ratio, if the sample volume is 0.4 mL, add 0.1 mL LAL. If using a sample volume of 0.2 mL, a volume of 0.05 mL of LAL is appropriate. Failure to mix adequately is a common cause of unsatisfactory tests. Pyrorell-T may be added most conveniently using a repeating pipettor. A fresh pipet or pipette is recommended for each entry into the Pyrorell-T vial. Different volumes of Pyrorell-T may be appropriate for other test protocols.
- For a microplate, add Pyrorell-T as rapidly as possible to all samples and mix from 5 to 30 seconds. Put the plate into an incubating plater reader.
- Once the incubation has started, do not disturb the reaction tubes). The laboratory bench supporting the incubator/optical reader should be free from excessive vibration.
- Read the test. Allow the test to run until all samples have incubated for significantly longer than the time required for the lowest standard endotoxin concentration to reaction on OD. Automated test systems will usually terminate the test after a preset period.

Results

- Preliminary calculations.**
Decrease the incubation time taken for specimens to reach a particular optical density threshold (usually 0.02 OD units in a tube reader or 0.03-0.1 OD units in a plate reader) after any data corrections have been made. Optical density readings must be relative to an initial reading taken to be OD units. The system software will do this. The time taken for the OD value is called the **onset time**.
- Construct a standard curve.**
Construct a standard curve by regression of the log onset time against the log endotoxin concentration for the standards. This is performed by the software). The equation for the regression line describes the standard curve.
- Calculate the endotoxin concentrations.**
Calculate endotoxin concentrations of all specimens (including standards and controls) using the line equation for a straight line:

Y = aX + b

where:

Y = log onset time

X = log endotoxin concentration

a = slope of the line

b = Y intercept.

This calculation is performed by a software.

Interpretation

- In order for a test to be valid, the endotoxin concentration of negative controls (estimated by extrapolation of the standard curve) should be significantly less than that of the lowest standard concentration.
- When a standard curve is included with the test, the absolute value of the correlation coefficient for the standard curve must be greater than or equal to 0.98.
- The mean measured endotoxin concentration of positive controls must be within 25% of the nominal concentration. Thus, if the positive control is 0.125 EU/mL, the measured concentration must be between 0.09375 and 0.15625 EU/mL.
- Determine the mean range of onset times for the standard curve. For example, if the range of times of two replicates of the highest standard endotoxin concentration are 107 and 110 seconds, and those for the lowest concentration are 1954 and 1968, the mean range of onset times is 1070 to 1101. Valid endotoxin concentrations can only be calculated for specimens with a mean onset time that falls within the mean range of onset times of the standard curve.
 - For example, a valid result can be given for an unknown that gives onset times of 1949 and 1965 (mean = 1957), despite the range of onset times of the replicates of the standard curve.
- In order to demonstrate that the specimen does not significantly interfere with the LAL/endotoxin reaction, the measured endotoxin concentration of the positive product control must be within 50 to 200% of the nominal concentration of the added endotoxin "spike." Before determining whether the spike is recovered within these limits, subtract the endotoxin concentration measured in the (unspiked) specimen. For example, in order to be considered free of significant interference, the measured endotoxin concentration in a 0.125 EU/mL positive product control (after subtraction of any endotoxin in the unspiked specimen) must be within the range 0.0625 - 0.25 EU/mL (50 to 200% of 0.125 EU/mL). If the measured endotoxin concentration in the unspiked specimen is 0.028 EU/mL and that in the positive product control is 0.163 EU/mL, the endotoxin attributable to the spike is 0.163 - 0.028=0.135 EU/mL. This is within the range and subject to other requirements being met; the test of the sample is valid.

Limitations of Procedure

The procedure is limited by the extent of the inhibition or enhancement capacity of the specimen under test. If the procedure cannot be validated (1, 2, 3) as a specimen 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 =	(L) (specimen dose)
	(endotoxin tolerance limit)

where L is in EU/mL, specimen dose is in its 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 specific concentration divided by the MVC.

The endotoxin tolerance limit (L) is 0.2 EU/kg for drugs with an intrathecal route of administration and 5 EU/kg for all other routes. The tolerance limit for drugs with an intrathecal route of administration is 0.2 EU/kg. The tolerance limit for 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.

The tripod can cause a false positive result unless denatured by heat treatment before testing. Materials such as blood, serum, albumin, and plasma may interfere with turbidimetric assays.

Expected Values

Endotoxin in specimens can be quantified between the range of standard endotoxin concentrations used to construct the standard curve. If it is necessary to dilute the specimen to overcome any inhibition or enhancement, the least amount of endotoxin that can be detected will be increased accordingly. Materials derived from biological sources, even after biochemical purification, may still 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.

Bibliography

- 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.
- Interim Guidance for Human and Veterinary Drug Products and Biologicals. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, July 15, 1991.
- Bacterial Endotoxins Test, USP 26 NF 2003.
- Howell, W.H. 1985. Observations on the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*. *Journal of Experimental Biology*, 64: 1-12.
- Tsuji, K. and F. B. Bang. 1964. Dry heat destruction of lipopolysaccharide. *Dry-heat destruction kinetics*. Appl. Environ. Microbiol. 36:710-714.
- Sweet, B. H. and J. E. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: *Depyrogenation, Technical Report No. 7*, 1985. Parental Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
- Gould, M. C. Endotoxin in 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 Pyrorell-T. We will replace any of our products that do not perform to product specifications; you must notify us before returning product.

Français

LYSAT D'AMEBOCYTES DE LIMULE

PYROTELL-T pour la détection et la détermination quantitative d'endotoxines bactériennes à Gram négatif (lipopolysaccharides)

Lorsque l'essai sur lysat d'ameboocytes de limule (LAL) est effectué conformément aux directives de la FDA (1), il peut être remplacé par le test de lysat des améboocytes (sur lapin) de la pharmacopée américaine pour les produits injectables. Le 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. L'US Bacterial Endotoxin Test (3) est l'essai officiel recommandé dans certaines monographies spécifiques de la pharmacopée américaine.

Résumé du Test

Le lysat d'ameboocytes de limule est un extrait aqueux provenant des cellules sanguines (améboocytes) du crabe - en fait de chevau - *Limulus polyphemus*. En présence d'endotoxines, le LAL devient trouble et, dans les conditions appropriées, forme un solide gélatineux. L'essai turbidimétrique est effectué en ajoutant un volume donné d'échantillon à un volume donné d'échantillon et en incubant le mélange réactionnel à 37°C. Plus la concentration d'endotoxines dans l'échantillon est élevée, plus la turbidité se développe rapidement. On peut utiliser la turbidité afin de quantifier la concentration d'endotoxines de deux façons. Avec la méthode LAL cinétique turbidimétrique, on détermine soit le taux d'augmentation de la turbidité, soit le temps requis pour atteindre un niveau prédéfini de turbidité. Plus la quantité d'endotoxine présente est importante, plus la turbidité se développe rapidement. De plus amples renseignements sur la réaction LAL et ses applications sont disponibles dans la littérature spécialisée (8, 9, 10).

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

Le LAL est utilisé pour la détection et la quantification d'endotoxines. La sensibilité d'un essai donné (designé par A) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour tracer la courbe d'étalement. Lors de l'utilisation des systèmes de détection automatisés d'endotoxine Pyros Kinetics et LAL-5000 (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection et donc la plus faible valeur possible de A, est 0,001 EU/mL.

turs supérieures à 37°C peuvent provoquer une détérioration rapide du Pyrorell-T lyophilisé, ce qui se manifeste par une perte de sensibilité et un jaunissement caractéristique du produit. Le Pyrorell-T est expédié entouré de pains réfrigérants dans un emballage thermiquement isolé pour protéger des températures élevées.

Le Pyrorell-T reconstitué est généralement transparent et légèrement opalescent. Une 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 flocculeuse ou une couleur jaune caractéristique indique une détérioration.

Le Pyrorell-T reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé: les flacons peuvent être conservés pendant 24 heures après leur fermeture à 25°C. Le Pyrorell-T peut être conservé sans précaution pendant 24 heures après leur fermeture, mais s'il est mélangé à l'eau, il peut être conservé pendant 24 heures après leur fermeture.

Les lots S ont été immédiatement congelés après reconstitution et maintenus à une température de -20°C ou inférieure. Une fois décongelés, les mêmes critères visuels de qualité s'appliquent que pour la reconstitution initiale.

Les échantillons doivent être prélevés aseptiquement dans des récipients aseptiques. L'utilisation de verrerie décontaminée réutilisée ou en plastique polystyrène stérile est recommandée afin de minimiser l'adsorption d'endotoxins à la surface des récipients. Tous les récipients en plastique ne sont pas dépourvus d'endotoxines détectables et de glucanes. Les récipients en plastique doivent être stériles et exempts d'endotoxines détectables et de glucanes. Les récipients en plastique peuvent être testés en prélevant au hasard des récipients dans le lot, en le rinçant avec un petit volume de LRW à température ambiante pendant une heure et en restant le liquide de rinçage comme un échantillon afin de déterminer si le lot de récipients est acceptable. Le liquide de rinçage doit contenir considérablement moins d'endotoxine que la plus faible concentration de standard endotoxine recommandée. Le rinçage ne doit ni inhiber ni activer l'essai, ce qui se détermine en retrouvant une quantité connue d'endotoxine ajoutée.

Le pH du milieu réactionnel (4 volumes d'échantillon pur ou d'échantillon dilué mélangés à 1 volume de Pyrorell-T ou auto ratio utilisé au cours du protocole) doit se situer entre 6 et 8. Ajuster le pH de l'échantillon avec HCl, NaOH ou un tampon (sans endotoxines détectables). Diluer le HCl concentré avec de l'eau stérile LAL de des normalités qui s'entraînent pas de dilution importante de l'échantillon. En cas de formation d'un précipité dans l'échantillon lors de la ajustement du pH, diluer l'échantillon (sans dépasser la dilution valide maximale - voir la section - Limites de la méthode -) avant d'ajuster le pH. Ou encore, reconstituer le Pyrorell-T avec un tampon approuvé de l'entreprise Associates of Cape Cod, Inc. et vérifier le pH du milieu réactionnel. Ne pas ajuster le pH avec une solution saline non tamponnée ou d'eau. Il se peut que la dilution de l'eau affecte les résultats du test.

Les substances qui dénaturent les protéines, chélatent les cations, lient les endotoxines ou altèrent leur état 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'unité d'endotoxine est ajoutée à un échantillon (voir la section - Limites de la méthode -). Les substances qui chélatent les cations, lient les endotoxines ou altèrent leur état 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'unité d'endotoxine est ajoutée à un échantillon (voir la section - Limites de la méthode -). Les substances qui chélatent les cations, lient les endotoxines ou altèrent leur état 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'unité d'endotoxine est ajoutée à un échantillon (voir la section - Limites de la méthode -). Les substances qui chélatent les cations, lient les endotoxines ou altèrent leur état 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'unité d'endotoxine est ajoutée à un échantillon (voir la section - Limites de la méthode -). Les substances qui chélatent les cations, lient les endotoxines ou altèrent leur état 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'unité d'endotoxine est ajoutée à un échantillon (voir la section - Limites de la méthode -). Les substances qui chélatent les cations, lient les endotoxines ou altèrent leur état 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'unité d'endotoxine est ajoutée à un échantillon (voir la section - Limites de la méthode -). Les