English

LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE

PYROCHROME®

for the Detection and Quantification of Gram Negative Bacteria Endotoxins (Lipopolysaccharides)

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

Summary of Test

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

Summary of Test

Limulus amebocyte lysate is an aqueous extract of blood cells (amebocytes) from the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. In the presence of endotoxin, factors in LAL are activated in a proteolytic cascade that results in the cleavage of a synthetic peptide-chromogen substrate present in Pyrochrome LAL. Proteolytic cleavage of the substrate liberates p-nitroaniline (pNA), which is yellow and absorbs at 405 nm. The test is performed by adding a volume of Pyrochrome to a volume of specimen and incubating the reaction mixture at 37°C. The greater the endotoxin concentration in the specimen, the faster pNA will be produced. Pyrochrome can be used to quantify endotoxin concentrations in two ways (3).

In the kinetic method, the time taken to reach a particular absorbance at 405 nm (the onset time) is determined. Higher endotoxin concentrations give shorter onset times. The assay requires specialized instrumentation to incubate multiple samples at a controlled temperature (usually 37°C) and to take optical density readings at regular intervals. Standard curves may be constructed by plotting the logarithm of the onset times against the logarithm of standard endotoxin and are used to calculate endotoxin concentrations in specimens.

Alternatively, in the endpoint chromogenic method, the amount of pNA released can be measured following a fixed incubation period. A standard curve relating endotoxin to measured optical density plotted against known standard endotoxin concentration, is used to determine concentrations in specimens. For samples that absorb at 405-410 nm, a diazo-coupling modification may be used. In this method, a diazo dye is formed by adding sulfanilamide (reagent 0) and hydrochloric acid, which is yellow and absorbs light at 405 nm. In this chromogenic adaptation of the LAL assay, coagulogen concentration is reduced by dilution to minimize interference when chromogenic substrate is added to the LAL. Thus, when endotoxin is added to Pyrochrome LAL, a clot will not form or be formed in preference to turbidity or a gel-clot. In all versions of the LAL assay (gel-clot, turbidimetric, and chromogenic), the greater the amount of endotoxin present, the faster the reaction (shorter gel-clot, turbidity, or color) develops. More information about the LAL assay types, reaction, and applications is available in the literature (10, 11, 12).

Reagent

Pyrochrome is packaged in lyophilized form in a 12 ml vial fill size. It contains an aqueous extract of amebocytes of *Limulus polyphemus*, dextran (stabilizer), EDTA, $CaCl_2$, $MgCl_2$, buffer and chromogenic substrate (Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroanilide).

Pyrochrome is not labeled with a specific sensitivity. Sensitivity in a given test (designated λ) is the lowest endotoxin concentration used to construct the standard curve. The greatest sensitivity, λ, of Pyrochrome is 0.005 EU/mL.

Pyrochrome is for *in-vitro* diagnostic purposes only. It is not intended for the diagnosis of endotoxemia in humans. The toxicity of Pyrochrome has not been determined. However, prolonged or repeated contact of LAL with the skin should be avoided as a Type I allergic reaction is some individuals (13). Thus, caution should be exercised when handling Pyrochrome.

Reconstitution Procedure:

1. Gently tap the vial of Pyrochrome to cause loose LAL to fall to the bottom. Break the vacuum by lifting the grey stopper. Do not continue reconstitution if the vacuum is not broken and discard the stopper; do not inject through or reuse the stopper. A small amount of LAL on the stopper will not affect the test.
2. Reconstitute Pyrochrome with 5.2 mL Pyrochrome Buffer or a compatible buffer available from Associates of Cape Cod, Inc. The pellet will take a few minutes to go into solution. Remove the stopper at least 5 minutes prior to use to allow any aerosols to settle. Avoid vigorous mixing that may cause excessive foaming and a loss of sensitivity. Cover the vial with Parafilm M® and store cold (2-8°C or on ice) when not in use. Pyrochrome must be used within 8 hours of reconstitution.

Storage Conditions

Lyophilized Pyrochrome is relatively stable and, if stored properly, will retain full activity through the expiration date on the label. Store the product at 2-8°C. Temperatures in excess of 37°C can cause rapid deterioration of lyophilized Pyrochrome as evidenced by the loss of sensitivity and a distinct yellowing of the product. Pyrochrome is shipped in insulated containers to protect against high temperatures. Pyrochrome, prior to reconstitution, is light sensitive and should be stored in the dark.

Reconstituted Pyrochrome is usually clear and slightly opalescent. An occasional lot will exhibit a slight, uniform turbidity. This opalescence will not affect the assay results (nor will endotoxin contamination not affect activity; however, flocculent precipitation or a distinct yellow color does indicate deterioration.

Reconstituted Pyrochrome is less stable than the lyophilized product; vials may be held for up to 8 hours at 2-8°C (or on ice). Reconstituted Pyrochrome cannot be frozen.

Specimen Collection and Preparation

Specimens should be collected aseptically in containers that are free of detectable endotoxin. Reused, depyrogenated glassware or sterile, disposable, polystyrene or polythylene terephthalate (PET) plastics are recommended to minimize adsorption of endotoxin to container surfaces. Not all plastic containers are free of detectable endotoxin. In addition, extractable substances from some plastics may interfere with the LAL test. Labware should be tested for acceptability by randomly selecting containers from a batch, rinsing them with a small volume of LAL Reagent Water (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. Glass or other containers that inhibit non-enhance the test as determined by recovery of a known amount of added endotoxin.

The pH of the reaction mixture is volume of specimen or specimen dilution mixed with an equal volume of Pyrochrome should be 6.0 - 8.0. Adjust the pH of specimens to LRW, Tris-HCl, or buffer (free of detectable endotoxin). Dilute concentrated HCl or NaOH with LRW and use in normalizes that will not lead to significant diluition of the test specimen. If a precipitate forms in the sample upon pH adjustment, dilute the sample prior to centrifuging. See also "Limitations of Procedure") before adjusting the pH. Do not adjust the pH of unbuffered saline or water. Note that dilution alone may change the pH of specimens.

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 specimen (see "Limitations of Procedure"). In most cases, dilution of the specimen will reduce the concentration and activity of interfering substances and still yield valid test results. Appropriate controls and dilutions must be determined for each specimen.

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 endotoxin should be tested for loss of endotoxin during storage.

Test Procedure

Test Reagents Supplied with Pyrochrome

1. *Pyrochrome* (see descriptions under Reagent and Reconstitution Procedure above).
2. *Pyrochrome Reconstitution Buffer*. Use the buffer to reconstitute Pyrochrome as described above.
3. *Control Standard Endotoxin* (CSE) – Diazo kit (CD060) only: Each vial of CSE contains 10 mg. Reconstituate CSE with the volume specified on the Certificate of Analysis (C of A), which gives the potency of the CSE. CSE has been specially formulated to give a pink solution rapidly. After adding LRW, vortex the vial for 30-60 seconds. CSE is then ready for use. If not used immediately, vortex the vial for 30 seconds prior to use. Then make appropriate dilutions to achieve the desired endotoxin concentrations in reagent grade water. Reconstituted CSE is stable for seven days when stored between 2 and 8°C. Do not freeze reconstituted CSE.

Each vial of CSE contains endotoxin whose activity has been determined with respect to the U.S. Reference Standard Endotoxin (RSE) and is stated on the C of A. The U.S. Reference Standard Endotoxin (designated is RSE) may be obtained from the U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.

Note: The C of A and the potency stated on it are specific to a combination of Pyrochrome and CSE lot. A given lot of CSE may show different potencies (EU/ng) when tested with different lots of Pyrochrome. Conversely, a given lot of Pyrochrome may show different potencies when tested with the same lot of Pyrochrome.

Be sure to use the correct C of A and potency.

Use CSE for preparation of standard endotoxin concentrations from which to construct standard curves, for positive controls and for positive product (interference) controls. Do not use this CSE as a depyrogenation control.

4. *Diazo reagents* – Diazo kit (CD060) only: Vial 1a, HCl; Vial 1, Sodium Nitrite; Vial 2, Ammonium sulfamate; Vial 3, NEDA. Reconstitute Vial 1 with entire contents of Vial 1a; reconstitute Vial 2 with 4 mL of water; and reconstitute Vial 3 with 4 mL of water. See item 5 below for grade of water required.

Test Reagents Not Supplied with Pyrochrome

1. *Control Standard Endotoxin* (CSE). (Associates of Cape Cod, Inc., catalog number EC010). Reconstituate CSE with the volume specified on the Certificate of Analysis (C of A), which gives the potency of the CSE and as directed in the package insert. Follow the directions in the insert for use and storage of standard endotoxin.
2. The potency of the CSE has been determined with respect to the U.S. Reference Standard Endotoxin (RSE) and is stated on the C of A. USP Endotoxin Reference Standard (designated is RSE) may be obtained from the U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Use the C of A and the potency stated on it are specific to a combination of Pyrochrome and CSE lot. A given lot of CSE may show different potencies (EU/ng) when tested with different lots of Pyrochrome. Pyrochrome, or other brands of LAL (1). Similarly, different lots of CSE will likely have different potencies when tested with the same lot of Pyrochrome. **Be sure to use the correct C of A and potency.**
3. *LAL Reagent Water* (LRW). Recommended sources include Associates of Cape Cod, Inc. (various sizes and packaging configurations available). Commercially available USP Sterile Water for Injection (sterile WFI) without bacteriostat or USP Water for Irrigation may be used provided that they have been shown to be acceptable for use as an LRW. The endotoxin limit for USP sterile WFI is only 0.25 EU/mL; therefore, sterile WFI may contain detectable endotoxin and be unsuitable for use.
5. Test tubes (10 x 75 mm) suitable as an LRW, test it as a specimen with a positive product control (see item 1.c. in the section on "Controls"). Use certified LRW 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 or endpoint assays for the standards. The standard curve should be at least (500 absolute value). The endotoxin concentration of 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. In addition, the endotoxin concentration of the positive product control should be within ± 25% of that of a positive control.
3. *Glucanolin® Buffer* Available from Associates of Cape Cod, Inc. (catalog number GB051) can be used in place of Pyrochrome Reconstitution Buffer to overcome interference from (1,3)-Beta-D-glucans.
4. *50% acetic acid* (for endpoint method). Prepare by adding a volume of glacial acetic acid to an equal volume of distilled or reverse osmosis (RO) water (LRW, see 2. above, may be used but is not required).
5. *Water* (for reconstitution of diazo-coupling reagents only). Any laboratory source of distilled (including LRW), deionized, or reverse osmosis water is acceptable. This water does not need to be endotoxin-free as it is used solely for diazo-coupling chemistry.

Materials and Equipment

1. *Microplates.* 96-well, covered microplates (available from Associates of Cape Cod, Inc., catalog number CA961). Plates should be certified or tested for endotoxin and/or glucan contamination or activity if these are a potential source of interference.
2. *Reaction tubes.* The end-point assays can also be run in 10 x 75 mm, depyrogenated, borosilicate glass culture tubes (available from Associates of Cape Cod, Inc. catalog number TB050).
3. *Optical reader*:capable of reading at 405 nm, or at 540-550 nm for the diazo method. For the kinetic method, the instrument must incubate the samples.

   For the endpoint method, use a plate reader to read microplates or, if running the test in tubes, a spectrophotometer with appropriate cuvettes.
4. *Incubator-*capable of maintaining 37°C for the kinetic (or endpoint methods only). A dry block incubator for microplates (or tubes, as appropriate) is recommended. (A water bath can be used for the endpoint test tube method.) Incubators should be shown to have a variance of ± 0.5°C or better.
5. *Test tube racks* to hold and/or incubate dilution and reaction tubes.
6. *Pipets*, micropipettors, and tips. Use pyrogen-free, preferably disposable, plastic syringe barrels. Disposable pipets and tips free of interfering endotoxins and glucans are recommended. Associates of Cape Cod, Inc., offers the Pyrocleaner® line of product, which are certified to be free of interfering endotoxin and glucan.
7. *Vortex-type mixer.*
8. *Parafilm M®* (American National Can™). The side in contact with the paper backing is hydrophobic and detectable endotoxin.
9. *Test tubes* that are free of interfering endotoxin with adequate capacity for making dilutions of endotoxin standards and for holding specimens. See "Specimen Collection and Preparation" for containers suitable for dilutions.
10. *Hot-air oven* with capacity to heat to at least 250°C for depyrogenation of glassware. Commonly used depyrogenation time and temperature are 30 minutes at 250°C. Use the oven as exposed to minimum time and temperature of 30 minutes and 250°C (2, 14, 15).

Controls

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

1. **Endotoxin controls.**
   1. **Endotoxin standard series**. Prepare a fresh set of dilutions from the stock endotoxin solution for each test. Do not use previously prepared and stored dilutions unless you have demonstrated the stability of that range of concentrations. Make dilutions in a geometric series. Use at least two (preferably three) endotoxin concentrations. Duplicate dilutions are recommended for endpoint methods; greater dilutions can be used for the kinetic method. The lowest endotoxin concentration in any standard series is the detection limit of that particular test and is designated λ (**Note:** a detection limit of 0.005 EU/mL is possible with Pyrochrome). To get to the range of standards required, use as few dilutions as possible with appropriate pipet sizes to minimize inaccuracy. Dilutions can be made in glass or suitable plastic test tubes or directly in a microplate. Maximum concentrations detected with Pyrochrome are method dependent. See the recommended dilution schemes provided with Pyrochrome reagents.
   2. **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. below). The concentration of endotoxin in the positive control should equal that of a standard from the middle of the standard curve. A 4x concentration is generally convenient for a concentration of standard 3, 5 or 6 serial dilution of standard endotoxin. A value of 0.5 EU/mL would be appropriate for positive controls included with a standard series that is comprised of 0.005, 0.05, 0.5, 5 and 50 EU/mL concentrations. Endotoxin-free water is not blank for this test, a positive control must be included to verify that it is appropriate to use the parameters of a previous (archived) standard curve to calculate endotoxin concentrations. Refer to the FDA guideline (1), under Standard Curve, and USP (2) for the LAL Test.
   3. Positive product controls are inhibition/enhancement controls and consist of the specimen or diluted specimen to which sufficient endotoxin standard 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.**
   1. Endotoxin-free 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 required dilution for the assay and proceed as described in the appropriate "Assay Section." 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 of the product by more than a factor of 16. (Note: Use a maximum dilution factor of 16 or less if the product is listed below or in the literature.) See the Dilution Recommendation and Calculation of Maximum Valid Dilution (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. A common problem with microplate incubators is uneven temperature distribution. Place the microplate in the incubator well in advance of use to allow wells, thus avoiding the heat problem and/or potential contamination through handling the plate.

1. Prepare test instrumentation as necessary. In an automated system this usually involves entering sample descriptors, setting test parameters, and turning on the incubator set at 37°C.
2. Add to the reaction vessel the appropriate volume of sample (negative control, endotoxin standard, specimen or specimen dilution, positive control). If a diluent is used, Pyrochrome is added (see 3. below). Use 0.05 mL for any method (kinetic, endpoint or diazo-coupling). Alternatively, use 0.1 mL for the kinetic and endpoint methods.
3. Add Pyrochrome as appropriate for the method:
   a. For a microplate, add Pyrochrome as rapidly as possible to all samples and mix from 5 to 30 seconds. Mixing time is dependent on the number of samples tested or you can an incubating plate reader (for a kinetic test). The volume of Pyrochrome added is equal to the sample volume (see 2. above; generally 0.05 mL, however, 0.1 mL can be used in the kinetic and endpoint methods). Pipet Pyrochrome into the reaction mixture as timers are determined for volumes of 0.05 mL.

   Failure to mix properly is a common cause of unsatisfactory tests. Pyrochrome may be added most conveniently using a repeating pipettor. Take care to avoid contaminating the vial of Pyrochrome when removing reagent.

   b. For methods using individual tubes or cuvettes, add 0.05 mL (or other volume) of Pyrochrome to each reaction vessel in turn, add Pyrochrome, mix for approximately 2 seconds and place the vessel into the incubating device.
4. Read the test.
   a. For the kinetic method, allow the test to run until all samples have incubated for significantly longer than the time required for the highest standard endotoxin concentration to reach the onset ODsw. Automated test systems will usually terminate the test after a preset period. See the recommended incubation times for guidance.
   b. For the endpoint method, read the incubated microplate or tubes in a plate or reaction tubes from the incubator, stop with 50% acetic acid (volume sufficient to give a final concentration 10% acetic acid: use 0.025 mL for sample/Pyrochrome volumes of 0.05 mL) and read the optical density (OD) in a spectrophotometer (or plate reader (as appropriate) at 405 nm. The test should be set up and read so that the incubation time for each sample is the same. Take care to avoid disturbing the reaction mixture. Depends on the endotoxin concentration range desired and is likely to vary with different lots of Pyrochrome. Preliminary tests may be necessary to determine the correct incubation period. See the recommended incubation times for guidance.
   c. For the endpoint method with diazo-coupling, remove the reaction tubes or plate from the incubator, stop with 0.05 mL of the HCl reconstituted sodium nitrite (solution 1). Add 0.05 mL of ammonium sulfamate (solution 2) after 1.1 minutes. Add 0.05 mL of NEDA (solution 3) to each. Full color (magenta) should develop immediately. Read the test at 540-550 nm. The test should be set up and read so that the incubation time for each sample is the same (within ±30 seconds). The incubation period depends on the endotoxin concentration range desired and is likely to vary with different lots of Pyrochrome. Preliminary tests may be necessary to determine the correct incubation period.

Results

1. Preliminary calculations.

a. For the kinetic method, determine the time taken for specimens to reach a particular optical density (onset time) and the endotoxin concentration (λ) of each standard. Curves may be made. Optical density readings must be relative to an initial reading taken to be zero OD units. Many plate readers have software suggesting that perform these calculations. The time taken to reach the OD value is called the onset time.

2. Construct a standard curve.

a. For the kinetic method, construct a standard curve by regression of the log onset time on the log endotoxin concentration for the standards. The equation for the regression line describes the standard curve.

b. For the endpoint method, construct a standard curve by plotting optical density readings against standard endotoxin concentrations.

3. Calculate the endotoxin concentrations.

Calculate endotoxin concentrations of all specimens (including standards and controls) using the equation for a straight line:

$$Y = aX + b \quad \text{(1)}$$

where:

Y = log onset time (kinetic method), or optical density (endpoint method)

X = log endotoxin concentration (kinetic method), or endotoxin concentration (end point method)

a = slope of the line

b = the Y intercept

Interpretation

1. In order for a test to be valid, the endotoxin concentration of negative controls (estimated by interpolation of the standard curve) should be significantly less than that of the lowest standard concentration.
2. The correlation coefficient for the standard curve included with the test should have an absolute value greater than 0.980.
3. The mean measured endotoxin concentration of positive controls (for verification of an unbiased recovery) should 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.
4. Endotoxin concentrations can only be reported for the range from the lowest to the highest standard endotoxin concentration. Results for specimens that lie outside of this range should be reported as either less than the lowest standard concentration (not detectable) or greater than the highest standard concentration.

   For the endpoint method, valid endotoxin concentrations can only be calculated from OD values that lie on the linear portion of the standard curve.
5. 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 added to the product (a "spike." Before determining whether the spike is recovered within these limits, subtract the endotoxin concentration measured in the (unspiked) specimen. The measured endotoxin concentration in a 0.125 EU/mL positive product control (after subtraction of any endotoxin in the unspiked specimen) must be between 0.0625-0.25 EU/mL. If the unspiked specimen is 0.025 EU/mL, the endotoxin concentration of the specimen under test is 0.028 EU/mL and that in the positive product control is 0.103 EU/mL, the endotoxin attributable to the spike is 0.103 – 0.028 = 0.075 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) at a specimen concentration that is greater than the minimum valid concentration (MVC), then the LAL test cannot be substituted for the USP Pyrogen Test. The MVC is calculated as follows:

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

where L 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 calculated by dividing the initial specimen concentration by the MVC.

The endotoxin tolerance limit for 18 EU/kg for a bolus with an intrathecal route of administration and 5 EU/kg for all other parenterals. The limit for medical devices is expressed per mL of an extraction or rinse volume (see the guidance described in the USP (10) based on the limits for devices. For devices that do not contact cerebrospinal fluid, the limit is 20 EU/device; for those that do, it is 2.15 EU/device. The limit for liquid devices is the same as that for drugs per the FDA guidelines (1, 2).

Some serine proteases (e.g. trypsin, activated blood factors) will cause a false positive result unless denatured by heat treatment before testing. Yellow-colored materials such as animal serum, albumin, and plasma may interfere with the chromogenic LAL assay. Some of these products, use the diazo-coupling assay (ACC catalog no. CD060). Excess turbidity in a sample may also interfere with the test unless the endotoxin is separated from the negative control (blank) or the sample treated in such a way as to remove the turbidity.

Expected Values

Endotoxin in specimens can be quantified between the range of standard endotoxin concentrations used to construct the standard curve. If the endotoxin in the specimen can be 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 contain endotoxin. Endotoxin may be released into blood by fractionation, 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 purification.

Bibliography

1. Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, USP current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Lindsey, G. L., A. P. E. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
4. Howell, W. H. 1985. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins Hospital Bull. 15:63-67.
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.
6. Levin, J. and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in extracellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
7. Levin, J. and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
8. Levin, J. and F. B. Bang. 1968. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
9. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa and K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. 81:1567-1569.
10. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:63-68.
11. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin and T. J. Novitsky (editors), Alan R. Liss, Inc., NY.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. Data: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.
13. Ebner, C., D. Kraft, E. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by *Limulus* lysate. Allergy 47:(suppl. 14):(abstract no. 1)(Proceedings of the 12th Congress of the European Federation of Allergy and Clinical Immunology, Madrid, Spain, 1992).
14. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
15. Sweet, B. H. and J. F. Hunnoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
16. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Français

LYSAT DE *LIMULUS*, AMÉBOCYTES

PYROCHROME®

pour la détection et la quantification des endotoxines des bactéries gram-négatives (lipopolysaccharides)

Le test du lysat d'amebocytes de limule (LAL), utilisé conformément aux recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) des É-U (1), peut remplacer le test d'apyrogénicité sur lapin de l'US Pharmacopeia (USP) (test de la fièvre du lapin) pour les produits injectables "chez l'usage humain (y compris les produits biologiques), de médicaments injectables à usage vétérinaire et de dispositifs médicaux ». Le test LAL est recommandé pour la quantification des endotoxines dans les produits bruts utilisés dans la production, notamment l'eau, et pour la surveillance des taux d'endotoxines dans la fabrication. Le Bacterial Endotoxins Test (2) est le test LAL officiel référence dans des monographies spécifiques de l'USP.

Résumé du test

Le lysat d'amebocytes de limule est un extrait aqueux de cellules sanguines (amebocytes) du crabe des Moluques *Limulus polyphemus*. En présence d'endotoxines, des facteurs du LAL sont activés en une cascade protéolytique qui libère un peptide-chromogène synthétique (aussi appelé substrat chromogène) présent dans le Pyrochrome LAL. Le clivage protéolytique du substrat libère de la p-nitroaniline (pNA), une substance jaune qui absorbe à 405 nm. Pour réaliser le test, ajouter un volume de Pyrochrome à un volume de spécimen et incuber le mélange réactif à une réaction à 37 °C. La vitesse de la production de pNA augmente avec la concentration d'endotoxines dans l'échantillon. Le test Pyrochrome peut être utilisé de deux manières pour quantifier la concentration d'endotoxines (3).

Avec la méthode cinétique, on détermine le temps nécessaire pour atteindre une certaine absorbance à 405 nm (temps de réaction). Plus la concentration d'endotoxines est élevée, plus le temps de réaction est court. Le test requiert une instrumentation spécialisée pour incuber plusieurs échantillons à une température contrôlée (généralement 37 °C) et pour mesurer la densité optique à intervalles réguliers. On peut tracer une courbe étalonnage en traçant le logarithme du temps de réaction en fonction du logarithme de la concentration d'une endotoxine étalon, et utiliser ces courbes pour calculer la concentration en endotoxines d'échantillons.

Autre méthode est la méthode chromogène en point final, dans laquelle on mesure la quantité de pNA libérée à une température donnée. Cette méthode, elle, établit une courbe d'étalonnage de la densité optique mesurée en fonction de concentrations connues d'endotoxine étalon, et on utilise cette courbe pour déterminer la concentration dans des échantillons. Les échantillons absorbant à 405-410 nm, on peut utiliser une modification par diazotation. Dans cette méthode, le pNA (formé avec la méthode chromogène) est transformé en une teinture rouge-violet par ajout de nitrite de sodium (réactif 1) et de chromogène), le point final (gel-caillot, turbidité ou couleur) apparaît d'autant plus vite que la concentration en endotoxines est élevée. Des informations complémentaires sur les types de test LAL, la réaction et les applications sont disponibles dans la littérature (10, 11, 12).

Réactif

Le Pyrochrome est conditionné sous forme lyophilisée dans un flacon de 3,2 mL. Il contient un extrait aqueux d'amebocytes de *Limulus polyphemus*, du dextrane (stabilisateur), de l'EDTA, du $CaCl_2$, du $MgCl_2$, un tampon et un substrat chromogène (Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroanilide).

Le Pyrochrome n'est pas étiqueté avec une sensibilité spécifique. La sensibilité d'un test donné (désignée λ) est la plus faible concentration d'endotoxines utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. La sensibilité la plus grande λ du Pyrochrome est de 0,005 UE/mL.

Le Pyrochrome est exclusivement destiné à des fins diagnostiques *in vitro*. Il n'est pas destiné au diagnostic de l'endotoxémie chez l'homme. Le Pyrochrome n'a pas fait l'objet d'une étude de toxicité. Cependant, le contact prolongé ou répété du LAL avec la peau a annoncé des réactions allergiques de type 1 chez certaines personnes (13). Il faut donc prendre des précautions lors de la manipulation du Pyrochrome.

Procédure de reconstitution :

1. Tapoter délicatement le flacon de Pyrochrome pour détacher le LAL qui tombe au fond du flacon. Rompre le vide en soulevant le bouchon gris. Ne pas contaminer l'orifice du flacon. Retirer le bouchon et l'éliminer ; ne pas injecter ni travers du bouchon et ne pas le réutiliser. La présence d'une petite quantité de LAL sur le bouchon n'affecte pas le test.
2. Reconstituer le Pyrochrome avec 5,2 mL de Pyrochrome Tampon ou un tampon compatible disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc. La solubilisation du lyophilisé prend quelques minutes ; il faut donc le réhydrater au moins 5 minutes avant l'utilisation. Tourner le flacon pour homogénéiser la solution ; ne pas agiter vigoureusement afin d'éviter la formation excessive de mousse et une perte de sensibilité. En dehors des périodes d'utilisation, couvrir le flacon de Parafilm M® et le conserver au froid (2-8°C). Ne pas placer. Le Pyrochrome doit être utilisé dans les 8 heures qui suivent la reconstitution.

Conditions de stockage

Le Pyrochrome lyophilisé est relativement stable ; stocké correctement, il conserve toute son activité jusqu'à la date de péremption indiquée. Conserver le produit entre 2 et 8 °C. Une température supérieure à 37 °C entraîne une détérioration rapide du Pyrochrome lyophilisé avec une diminution de la sensibilité et un net jaunissement du produit. Le Pyrochrome est livré dans des conteneurs isothermes pour le protéger des températures élevées. Avant la reconstitution, le Pyrochrome est sensible à la lumière et doit être conservé à l'obscurité.

Le Pyrochrome reconstitué est généralement transparent et légèrement opalescent. Certains lots peuvent parfois montrer une légère turbidité homogène. La présence de petites fibres ou de floculats indique que le Pyrochrome s'est détérioré. Le produit ne prend pas une floculation ou une nette coloration jaune indique cependant une détérioration.

Le Pyrochrome reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé ; on peut le conserver pendant 8 heures entre 2 et 8 °C (ou sur glace). Ne pas congeler le Pyrochrome reconstitué.

Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons doivent être prélevés aseptiquement dans des récipients exempts d'endotoxines détectables. Pour minimiser l'adsorption d'endotoxines sur les surfaces du contenant, il est recommandé d'utiliser des flacons en verre réutilisables dépyrogénés ou des plastiques jetables en polystyrène ou polyéthylène téréphtalate (PET). Tous les contenants en plastique ne sont pas exempts d'endotoxines détectables. De plus, des substances extractibles issues de certains plastiques peuvent interférer avec le test LAL ; l'adéquation du matériel de laboratoire doit être testée en sélectionnant de manière aléatoire des flacons d'un lot. Rincer ces flacons avec un petit volume d'eau pour réactif LAL (ERL) à température ambiante pendant une heure, et tester l'eau de rinçage comme un échantillon. Lorsque le rinçage doit contenir significativement moins d'endotoxines que la plus faible concentration d'étalon à utiliser. En outre, l'eau de rinçage ne doit pas inhiber ni augmenter le test, ce qui se vérifie en ajoutant la quantité d'endotoxine étalon mesurée précédemment.

Le pH du mélange réactionnel (un volume d'échantillon ou d'échantillon dilué, mélangé à un volume de Pyrochrome) doit être compris entre 6,0 et 8,0. Ajuster le pH des échantillons avec du HCl, du NaOH ou un tampon (exempt d'endotoxines détectables). Diluer le HCl ou le NaOH concentré avec de l'ERL et utiliser des normalités qui n'entraînent pas de dilution importante du spécimen testé. Si un précipité se forme dans l'échantillon lors de l'ajustement du pH, diluer l'échantillon avant d'ajuster le pH (après avoir lu DMV – voir la section « Limites de la procédure »). Ne pas ajuster le pH d'eau ou de sérum physiologique non tamponnés. Notons que la dilution seule peut modifier le pH des échantillons.

Les substances qui dénaturent les protéines, chélatent des ions, se lient aux endotoxines ou altèrent l'état hydrophobe des endotoxines peuvent interférer avec le test. Une interférence peut être détectée par une augmentation ou une diminution significative de la récupération d'endotoxines après l'ajout d'une quantité connue d'endotoxine étalon à l'échantillon (voir la section « Limites de la procédure »). Dans la plupart des cas, la dilution de l'échantillon réduit la concentration et l'activité des substances interférentes et génère des résultats de test valides. Les contrôles appropriés et les schémas de dilution sont présentés dans la section « Procédure de test ».

Les échantillons doivent être testés le plus rapidement possible après le prélèvement. Il est conseillé de congeler les échantillons stériles qui doivent être stockés ou expédiés avant le test. Les échantillons censés contenir de faibles concentrations d'endotoxines doivent être testés pour une perte d'endotoxines pendant la conservation.

Procédure de test

Réactifs de test fournis avec le Pyrochrome

1. *Pyrochrome* (voir la description plus haut dans les sections « Réactif » et « Procédure de reconstitution »).
2. *Tampon de reconstitution Pyrochrome*. Utiliser le tampon pour reconstituer le Pyrochrome comme décrit plus haut.
3. *Endotoxine étalon de contrôle* (EEC) – Kit de diazotation (CD060) uniquement : Chaque flacon d'EEC contient 10 mg. Reconstituer l'EEC avec le volume spécifié sur le certificat d'analyse (CA) indiquant la puissance de l'EEC. L'EEC est spécialement formulée pour une dissolution rapide. Après ajout de l'ERL, mélanger le flacon avec un agitateur vortex pendant 30-60 secondes. L'EEC est alors prête à l'utilisation. Si l'utilisation n'est pas immédiate, mélanger le flacon avec un agitateur vortex pendant 30 secondes avant l'utilisation. Préparer des dilutions appropriées dans de l'eau réactif de qualité supérieure désirées d'endotoxines. Mélanger à l'agitateur vortex entre les dilutions. Conservé entre 2 et 8 °C, l'EEC reconstituée reste stable pendant sept jours. Ne pas congeler l'EEC reconstituée.

   Chaque flacon d'EEC cont

Probenvorbereitung – Bestimmung der Testverdünnung

Wenn bereits ein Testprotokoll für den zu testenden Probentyp entwickelt wurde, die für den Test notwendige Verdünnung herstellen und wie unter „Testdurchführung" beschrieben fortfahren. Wenn für den Probentyp noch kein Protokoll entwickelt wurde, eine Reihe aus zehnfachen Verdünnungen der Probe herstellen. Die maximal zulässige Verdünnung des Produktes höchstens um den Faktor 10 überschreiten. (Erläuterungen und Rechenbeispiele zur maximal zulässigen Verdünnung [MZV] und zur minimal zulässigen Konzentration [MZK] sind im Abschnitt „Grenzen des Verfahrens" unten oder in der FDA-Richtlinie [1] zu finden.) Zweckdienliche Verdünnungen aller Proben zubereiten, jeweils mit einer Positivkontrolle.

Testdurchführung

Zum Erreichen zufriedenstellender Ergebnisse ist eine gleichbleibende Technik notwendig. Alle Kontrollen und Proben müssen (mindestens) in Doppelbestimmung getestet werden. Bei Mikrotiterplatten-Inkubatoren treten häufig Probleme durch niedrigere Temperaturen am Außenrand auf. Eventuell kann es notwendig sein, die am Rand liegenden Kavitäten leer zu lassen, wodurch das Temperaturproblem und auch potenzielle Kontaminationen durch das Hantieren mit der Platte vermieden werden.

1. Die Testinstrumente nach Bedarf vorbereiten. Bei einem automatischen System bedeutet dies in der Regel das Eingeben der Probenbeschreibungen, das Einstellen der Testparameter und das Einschalten des auf 37 °C eingestellten Inkubators.
2. Das entsprechende Probenvolumen (Negativkontrolle, Endotoxin-Standard, Probe oder Produkt-Positivkontrolle) in das Reaktionsgefäß geben, so dass beim Zusatz von Pyrochrome ein Verhältnis von 1:1 zustande kommt (siehe 3. unten). 0,05 mL für alle Methoden (kinetisch, Endpunkt oder Azokupplung) verwenden. Als Alternative kann für die kinetische und die Endpunktmethode auch 0,1 mL verwendet werden.
3. Entsprechend der Methode Pyrochrome zusetzen:
   a. Bei einer Mikrotiterplatte das Pyrochrome so rasch wie möglich allen Proben zusetzen und 5 bis 30 Sekunden lang mischen. Die Platte entweder auf einen Inkubatorblock (bei einem Endpunkttest) oder in ein Plattenphotometer mit Inkubator (bei einem kinetischen Test) stellen. Das zugesetzte Pyrochrome-Volumen ist gleich dem Probenvolumen (siehe oben unter 2.; generell 0,05 mL, jedoch kann für die kinetische und die Endpunktmethode auch 0,1 mL verwendet werden). Es sei darauf hingewiesen, dass die empfohlenen Inkubationszeiten sich auf ein Volumen von 0,05 mL beziehen.
   Unbefriedigende Testergebnisse sind oft auf unzureichendes Mischen zurückzuführen. Der Zusatz von Pyrochrome geschieht am einfachsten mit einer Mehrkanalpipette. Bei der Reagenzentnahme ist besonders darauf zu achten, dass eine Kontamination des Pyrochrome-Fläschchens vermieden wird.
   b. Bei Methoden mit einzelnen Reaktionsröhrchen oder Küvetten ist die Einhaltung gleicher Zeiten für alle Röhrchen von entscheidender Bedeutung. Jedem Reaktionsgefäß der Reihe nach Pyrochrome zusetzen, etwa 2 Sekunden lang mischen und das Röhrchen dann in den Inkubator stellen.
4. Das Testergebnis ablesen.
   a. Bei der kinetischen Methode den Test so lange laufen lassen, bis alle Proben deutlich länger inkubiert wurden, als es dauert, bis die niedrigste Endotoxinstandard-Konzentration den „Onset"-OD_{405}-Wert erreicht hat. Automatische Testsysteme brechen üblicherweise den Test nach einer zuvor eingestellten Dauer ab. Die empfohlenen Inkubationszeiten bieten Richtwerte.
   b. Bei der Endpunktmethode die Inkubationszeit genau messen, die Platte bzw. die Reaktionsröhrchen aus dem Inkubator nehmen, mit 50%iger Essigsäure stoppen (das Volumen muss eine Endkonzentration von 10% Essigsäure ergeben; für Proben- und Pyrochrome-Volumen von je 0,05 mL sind 0,025 mL zu verwenden) und die optische Dichte (OD) bei 405 nm in einem Spektrophotometer bzw. Plattenphotometer ablesen. Der Test sollte so gestaltet und ausgewertet werden, dass die Inkubationszeit für alle Proben gleich ist (innerhalb von ±30 Sekunden). Die Inkubationsdauer hängt vom gewünschten Bereich der Endotoxinkonzentrationen ab und ist wahrscheinlich von einer Pyrochrome-Charge zur anderen unterschiedlich. Eventuell sind zur Bestimmung der richtigen Inkubationsdauer Vortests erforderlich. Die empfohlenen Inkubationszeiten bieten Richtwerte.
   c. Bei der Endpunktmethode mit Azokupplung die Reaktionsröhrchen bzw. die Platte aus dem Inkubator nehmen und die Reaktion mit 0,05 mL Lösung 1 (mit HCl rekonstituiertes Natriumnitrit) stoppen. In jede Reaktionskavität 0,05 mL Lösung 2 (Ammoniumsulfamat) geben. In jede Kavität 0,05 mL Lösung 3 (NEDA) geben. Der Farbumschlag nach Magenta sollte sofort und vollständig erfolgen. Den Test bei 540 nm bis 550 nm ablesen. Der Test sollte so gestaltet und ausgewertet werden, dass die Inkubationszeit für alle Proben gleich ist (innerhalb von ±30 Sekunden). Die Inkubationsdauer hängt vom gewünschten Bereich der Endotoxinkonzentrationen ab und ist wahrscheinlich von einer Pyrochrome-Charge zur anderen unterschiedlich. Eventuell sind zur Bestimmung der richtigen Inkubationsdauer Vortests erforderlich.

Ergebnisse

1. **Vorläufige Berechnungen.**
   a. Bei der kinetischen Methode die Zeit bestimmen, die die Proben bis zum Erreichen einer bestimmten Schwellen-OD (normalerweise 0,03 OD-Einheiten) benötigen, unter Berücksichtigung aller etwaigen Datenkorrekturen. Die OD-Werte müssen sich auf einen als null OD-Einheiten definierten Ausgangswert beziehen. Plattenphotometer verfügen oft über Software, die diese Berechnungen vornimmt. Die Zeit bis zum Erreichen des OD-Wertes heißt „onset time".
2. **Eine Standardkurve erstellen.**
   a. Bei der kinetischen Methode wird eine Standardkurve erstellt durch Regression der logarithmischen „onset time" über der logarithmischen Endotoxinkonzentration der Standards. Die Gleichung für die Regressionslinie beschreibt die Standardkurve.
   b. Bei der Endpunktmethode wird die Standardkurve erstellt durch Auftragen der OD-Werte über den Endotoxinkonzentrationen der Standards.
3. **Die Endotoxinkonzentrationen berechnen.**
   Die Endotoxinkonzentrationen für alle Proben (einschließlich Standards und Kontrollen) anhand der Gleichung für eine Gerade berechnen:

$$Y = aX + b$$

wobei:

Y = logarithmische „onset time" (kinetische Methode) oder optische Dichte (Endpunktmethode)
X = logarithmische Endotoxinkonzentration (kinetische Methode) oder Endotoxinkonzentration (Endpunktmethode)
a = Steigung der Geraden
b = Y-Achsenabschnitt

Interpretation

1. Damit ein Test gültig ist, muss die (durch Extrapolation der Standardkurve geschätzte) Endotoxinkonzentration der Negativkontrollen deutlich unter derjenigen des niedrigsten Standards liegen.
2. Der Korrelationskoeffizient für die im Test enthaltene Standardkurve sollte einen Absolutwert von über 0,980 haben.
3. Der Durchschnitt der gemessenen Endotoxinkonzentrationen der Positivkontrollen (bei Bestätigung einer Archivkurve) darf nicht mehr als 25% von der Nennkonzentration abweichen. Bei einer Positivkontrolle von 0,125 EU/mL muss der Messwert also zwischen 0,09375 EU/mL und 0,15625 EU/mL liegen.
4. Endotoxinkonzentrationen können nur im Konzentrationsbereich vom niedrigsten bis zum höchsten Endotoxinstandard angegeben werden. Ergebnisse für Proben, die außerhalb dieses Bereiches liegen, sollten als unterhalb der niedrigsten Standardkonzentration (nicht nachweisbar) bzw. oberhalb der höchsten Standardkonzentration angegeben werden.
   Bei der Endpunktmethode können gültige Endotoxinkonzentrationen nur aus OD-Werten berechnet werden, die im linearen Teil der Standardkurve liegen.
5. Zur Bestätigung, dass die Probe die LAL/Endotoxinreaktion nicht wesentlich stört, muss die gemessene Endotoxinkonzentration der Produkt-Positivkontrolle innerhalb von 50% bis 200% der Nennkonzentration des Endotoxinzusatzes („Spike") liegen. Vor der Bestimmung, ob der „Spike" innerhalb dieser Grenzwerte wiedergefunden wurde, die in der (ungespikten) Probe gemessene Endotoxinkonzentration subtrahieren. Zum Beispiel muss die gemessene Endotoxinkonzentration einer Produkt-Positivkontrolle von 0,125 EU/mL (nach der Subtraktion etwaiger Endotoxine in der ungespikten Probe) im Bereich von 0,0625 EU/mL bis 0,25 EU/mL (50% bis 200% von 0,125 EU/mL) liegen, damit diese als frei von wesentlicher Interferenz angesehen werden kann. Beträgt die gemessene Endotoxinkonzentration in der ungespikten Probe 0,028 EU/mL und die in der Produkt-Positivkontrolle 0,163 EU/mL, dann sind 0,163 EU/mL – 0,028 EU/mL = 0,135 EU/mL Endotoxine auf den „Spike" zurückzuführen. Dieser Wert liegt im zulässigen Bereich und der Test der Probe ist gültig, vorausgesetzt, die anderen Anforderungen sind erfüllt.

Grenzen des Verfahrens

Das Verfahren wird durch das Ausmaß der Hemm- bzw. Verstärkungsfähigkeit der getesteten Probe begrenzt. Falls das Verfahren nicht bei einer Probenkonzentration oberhalb der minimal zulässigen Konzentration (MZK) validiert werden kann (1, 2), dann kann der LAL-Test nicht anstelle des Pyrogentests nach USP verwendet werden. Die MZK berechnet sich wie folgt:

$$MZK = \frac{(\lambda)\ (\text{Probendosis})}{(\text{Endotoxin-Toleranzgrenzwert})}$$

wobei λ in EU/mL, die Probendosis in Einheiten pro kg Körpergewicht und der Endotoxin-Toleranzgrenzwert in EU/kg angegeben wird.

Die maximal zulässige Verdünnung (MZV) ist die Probenverdünnung, die die MZK enthält (1). Sie wird berechnet, indem man die Ausgangs-Probenkonzentration durch die MZK dividiert.

Der Endotoxin-Toleranzgrenzwert beträgt 0,2 EU/kg bei Arzneimitteln zur intrathekalen Verabreichung und 5 EU/kg für alle anderen parenteralen Arzneimittel. Für Medizinprodukte wird der Grenzwert pro mL eines Extrakt- bzw. Spülvolumens angegeben, das wie in der USP (16) beschrieben gewonnen wurde, auf Grundlage der Grenzwerte für Medizinprodukte. Bei Medizinprodukten, die nicht mit dem Liquor cerebrospinalis in Kontakt kommen, beträgt der Grenzwert 20 EU pro Produkt, anderenfalls 2,15 EU pro Produkt. Nach der FDA-Richtlinie (1) ist der Grenzwert für flüssige Medizinprodukte der gleiche wie für Arzneimittel.

Manche Serinproteasen (z.B. Trypsin, aktivierte Blutfaktoren) verursachen falsch positive Ergebnisse, wenn sie nicht vor dem Test durch Hitzebehandlung inaktiviert werden. Gelbliche Materialien wie z.B. Tierserum, Albumin und Plasma können den chromogenen Test auf pNA-Basis stören. Für diese Stoffe ist der Test mit Azokupplung zu verwenden (ACC Katalognr. CD060). Übermäßige Trübung einer Probe kann gleichfalls den Test stören, es sei denn, die Trübung lässt sich von der Negativkontrolle (der Leerwertprobe) subtrahieren oder die Probe kann derart behandelt werden, dass die Trübung verschwindet.

Erwartungswerte

Die Endotoxine in den Proben lassen sich im Bereich der Konzentrationen der Endotoxinstandards, mit denen die Standardkurve erstellt wurde, quantitativ bestimmen. Falls zur Behebung von Störfaktoren eine Verdünnung der Probe notwendig ist, erhöht sich die kleinste nachweisbare Endotoxinmenge entsprechend. Materialien biologischer Herkunft können selbst nach einer biochemischen Reinigung noch messbaren Endotoxingehalt aufweisen. Wasser, das durch Destillation, Umkehrosmose oder Ultrafiltration gewonnen wurde, kann einen Endotoxingehalt unterhalb der Nachweisgrenze aufweisen, vorausgesetzt, der Reinigungsprozess arbeitet ordnungsgemäß und das Wasser wird nach der Produktion nicht kontaminiert.

Literatur

1. Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, USP, aktueller Revisionsstand, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky und T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. **27**:947-951.
4. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus, Callinectes hastatus,* and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular **43**:4-5.
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.
6. Levin, J. und F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. **115**:337-345.
7. Levin, J. und F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. **19**:186-197.
8. 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.
9. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa und K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. **81**:1567-1569.
10. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus **27**:13-18.
11. 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 (Hg.), Alan R. Liss, Inc., NY.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.
13. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner und H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy **22**:417-419.
14. Tsuji, K. und S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. **36**:710-714.
15. Sweet, B. H. und J. F. Huxsoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
16. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, Kapitel <161>, USP, aktueller Revisionsstand, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Unser erfahrenes Personal bespricht den LAL-Test in praktischer und theoretischer Hinsicht gerne mit Ihnen. Rufen Sie bei Fragen zum Umgang mit Pyrochrome bitte an. Wir ersetzen jedes unserer Produkte, falls es nicht die in den Produktspezifikationen angegebene Leistung erbringen sollte. Setzen Sie sich vor einer Rücksendung bitte mit dem Kundendienst in Verbindung.

Italiano

LISATO DEGLI AMEBOCITI DEL *LIMULUS*

PYROCHROME®

per il rilevamento e la determinazione quantitativa delle endotossine batteriche Gram-negative (lipopolisaccaridi)

Se impiegato attenendosi alle linee guida della Food and Drug Administration (FDA) statunitense (1), il test del lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL), può sostituire il test dei pirogeni (test della febbre del coniglio) della U.S. Pharmacopeia (USP) per testare a prodotto finito i "farmaci iniettabili per uso umano (inclusi i prodotti biologici), i farmaci iniettabili per uso veterinario e i dispositivi medici." Il test LAL è indicato per la determinazione quantitativa di endotossina in materie prime (acqua inclusa) impiegate nella produzione e per il monitoraggio di processo dei livelli di endotossina. Il Bacterial Endotoxins Test (2) della USP è il test LAL ufficiale a cui si fa riferimento in specifiche monografie USP.

Breve descrizione del test

Il lisato degli amebociti del *Limulus* è un estratto acquoso di cellule ematiche (amebociti) del granchio a ferro di cavallo, il *Limulus polyphemus*. In presenza di endotossina, i fattori del LAL sono attivati in una cascata proteolitica che determina la scissione di un substrato peptidico artificiale e incolore presente nel LAL Pyrochrome. La scissione proteolitica del substrato libera p-nitroanilina (pNA), di colore giallo, che assorbe la luce a 405 nm. Il test viene eseguito aggiungendo un volume di Pyrochrome a un volume di campione e incubando la miscela di reazione a 37 °C. Quanto maggiore è la concentrazione di endotossine nel campione, tanto più rapida sarà la produzione di pNA. Ai fini della determinazione quantitativa della concentrazione di endotossine, Pyrochrome può essere usato in due modi diversi (3).

Nel metodo cinetico, viene determinato il tempo necessario per ottenere una particolare assorbanza a 405 nm (il tempo di inizio). Concentrazioni più elevate di endotossine determinano tempi di inizio più brevi. Il dosaggio richiede una strumentazione specializzata per l'incubazione di più campioni a una temperatura controllata (di solito 37 °C) e per l'esecuzione a intervalli regolari delle letture di densità ottica. Le curve standard, costruite tracciando il logaritmo del tempo di inizio in funzione della concentrazione di endotossina standard, vengono usate per calcolare le concentrazioni di endotossine nei campioni.

In alternativa, nel metodo endpoint cromogenico, la quantità di pNA liberata può essere misurata al termine di un periodo di incubazione predeterminato. Per determinare le concentrazioni nei campioni viene usata una curva standard, costituita dalla densità ottica misurata tracciata in funzione delle concentrazioni note di endotossina standard. Per i campioni che assorbono la luce a 405-410 nm, può essere usato un dosaggio di tipo diazoico. In questo metodo, la pNA (formatasi durante il metodo endpoint cromogenico) viene fatta reagire con nitrito in HCl e poi con N-(1-Naftil)-etilenediamina (NEDA) per formare un derivato diazotato della fucsina che assorbe la luce in un range compreso tra 540 e 550 nm.

I metodi LAL Pyrochrome sono rapidi, specifici, semplici da eseguire e altamente sensibili. Il limite di rilevamento dipende dal metodo e dalla strumentazione usati e può giungere a rilevare la presenza di 0,005 unità endotossiniche (EU) per mL.

Storia e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1885 (4). Negli anni '50, presso il Marine Biological Laboratory di Woods Hole, nel Massachusetts, USA, Bang scoprì che i batteri Gram-negativi provocavano la coagulazione del sangue del *Limulus* (5). Levin e Bang determinarono successivamente che la reazione era enzimatica e che gli enzimi si trovavano nei granuli degli amebociti (6, 7). Essi dimostrarono che la coagulazione viene avviata da un particolarissimo componente strutturale della parete cellulare dei batteri chiamato endotossina o lipopolisaccaride (8). In base alle conoscenze attuali si ritiene che la reazione consista in una cascata di passaggi di attivazione enzimatica che termina con la scissione del peptide, il coagulogeno. Il prodotto insolubile della scissione del coagulogeno (coagulina) si aggrega mediante interazione ionica. Se si forma una quantità sufficiente di coagulina, il prodotto diventa dapprima torbido, quindi gelifica con formazione di coagulo. Questa interazione è il presupposto di base del dosaggio per endotossina chiamato test del lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL). Nel 1977, ricercatori giapponesi scoprirono che il LAL attivato da endotossina era in grado di scindere anche piccoli peptidi cromogenici che contenevano un sito di scissione degli aminoacidi simile al coagulogeno e al cromoforo, il p-nitroanilide (9). La scissione comporta la liberazione di pNA, di colore giallo, che assorbe la luce a 405 nm. In questo adattamento cromogenico del dosaggio LAL, la concentrazione del coagulogeno viene ridotta mediante diluizione per ridurre al minimo l'interferenza quando il substrato cromogenico viene aggiunto al LAL. Pertanto, quando l'endotossina viene aggiunta al LAL cromogenico, si sviluppa colore invece che torbidità o gelificazione con formazione di coagulo. In tutte le versioni del dosaggio LAL (metodo gel-clot, turbidimetrico, cromogenico), quanto maggiore è la quantità di endotossine presenti, tanto più rapidamente si raggiunge l'endpoint (gelificazione con formazione di coagulo, torbidità o colorazione). Ulteriori informazioni sui tipi di dosaggi LAL, reazione chimica e applicazioni sono reperibili nella letteratura pertinente (10, 11, 12).

Reagente

Pyrochrome è confezionato in forma liofilizzata in fiale da 3,2 mL. Contiene un estratto acquoso di amebociti del *Limulus polyphemus*, destrano (stabilizzante), EDTA, $CaCl_2$, $MgCl_2$, tampone e substrato cromogenico (Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroanilide).

L'etichetta di Pyrochrome non indica una sensibilità specifica. La sensibilità in un dato test (indicata con λ) è definita dalla più bassa concentrazione di endotossina utilizzata per costruire la curva standard. La sensibilità massima, λ, di Pyrochrome è 0,005 EU/mL.

Pyrochrome è esclusivamente per uso diagnostico *in vitro* e non è indicato per la diagnosi di endotossiemia nell'uomo. La tossicità di Pyrochrome non è stata stabilita. Tuttavia, il contatto prolungato o ripetuto del LAL con la cute ha provocato reazione allergica di Tipo I in alcuni individui (13). Pertanto usare prudenza nel maneggiare Pyrochrome.

Procedura di ricostituzione

1. Picchiettare leggermente la fiala di Pyrochrome per far cadere sul fondo i residui di LAL. Eliminare il vuoto sollevando il tappo grigio. Non contaminare l'imboccatura della fiala. Togliere il tappo e gettarlo; non iniettare attraverso il tappo e non riutilizzarlo. Una piccola quantità di LAL sul tappo non influisce sull'esito del test.
2. Ricostituire Pyrochrome con 3,2 mL di tampone Pyrochrome o un tampone compatibile fornito su richiesta da Associates of Cape Cod, Inc. Dato che sono necessari alcuni minuti perché il granulo si sciolga, reidratarlo almeno 5 minuti prima dell'uso. Agitare la fiala per ottenere un prodotto omogeneo, evitando tuttavia di miscelarlo vigorosamente per non creare una quantità eccessiva di schiuma e causare perdita di sensibilità. Coprire la fiala con Parafilm M® e conservarla al freddo (a 2-8 °C oppure sotto ghiaccio) quando non viene utilizzata. Pyrochrome deve essere usato entro 8 ore dalla ricostituzione.

Condizioni di conservazione

Il Pyrochrome liofilizzato è relativamente stabile e, se conservato correttamente, mantiene la completa attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Conservare il prodotto a 2-8 °C. Temperature superiori a 37 °C possono provocare un rapido deterioramento del Pyrochrome liofilizzato, indicato da perdita di sensibilità e marcato ingiallimento del prodotto. Pyrochrome è spedito in contenitori isolati che lo proteggono dalle temperature elevate. Prima della ricostituzione, Pyrochrome è sensibile alla luce e va quindi conservato al buio.

Il Pyrochrome ricostituito è normalmente trasparente e leggermente opalescente. Qualche lotto potrebbe presentare una leggera e uniforme torbidità. La presenza di piccole fibre o filamenti non è indice di contaminazione e non ha alcun effetto sull'attività; una precipitazione flocculenta o una netta colorazione gialla indicano invece deterioramento.

Il Pyrochrome ricostituito è meno stabile del prodotto liofilizzato; le fiale possono essere conservate per non più di 8 ore a 2-8 °C (oppure sotto ghiaccio). Il Pyrochrome ricostituito non può essere congelato.

Raccolta e preparazione dei campioni

I campioni devono essere raccolti asetticamente in contenitori esenti da endotossina rilevabile. Si consiglia l'utilizzo di vetreria riutilizzabile depirogenata o di contenitori in plastica, sterili e monouso, in polistirene o polietilene tereftalato (PET) per ridurre al minimo l'adsorbimento dell'endotossina alle superfici dei contenitori. Non tutti i contenitori in plastica sono esenti da endotossina rilevabile. Inoltre, sostanze estraibili da alcuni tipi di plastica possono interferire con il test LAL. Per determinare l'idoneità della vetreria, selezionare a caso alcuni contenitori di un lotto, risciacquarli con un piccolo volume di reagente acqua per LAL (LRW), lasciarli riposare a temperatura ambiente per un'ora e analizzare la soluzione di risciacquo come se si trattasse di un campione. La soluzione di risciacquo deve contenere una concentrazione di endotossina considerevolmente inferiore alla più bassa concentrazione standard da utilizzare. Inoltre, la soluzione di risciacquo non deve né inibire né attivare il test; ciò va determinato mediante recupero di una quantità nota di endotossina aggiunta al campione.

Il pH della miscela di reazione (un volume di campione o campione diluito miscelato con un volume equivalente di Pyrochrome) deve essere compreso tra 6 e 8. Correggere il pH del campione con HCl, NaOH o tampone (esente da endotossina rilevabile). Diluire HCl o NaOH concentrati con LRW portando a normalità che non determinino una significativa diluizione del campione in esame. Se alla correzione del pH nel campione si forma precipitato, diluire il campione (senza superare la massima diluizione valida (MVD) – vedere "Limiti della procedura") prima di correggere il pH. Non correggere il pH di soluzioni fisiologiche non tamponate o acqua. A volte la semplice diluizione può risolvere i problemi di pH.

Le sostanze che denaturano le proteine, chelano gli ioni, legano l'endotossina o alterano lo stato idrofobico dell'endotossina possono causare interferenza nel test. L'interferenza può essere rilevata mediante il recupero di endotossina, maggiore o minore del previsto, da una quantità nota di endotossina standard aggiunta al campione (vedere "Limiti della procedura"). Nella maggioranza dei casi, la diluizione del campione riduce la concentrazione e l'attività delle sostanze interferenti, consentendo comunque di ottenere risultati validi. Controlli e schemi di diluizione appropriati sono trattati nella sezione "Procedura di analisi".

I campioni vanno analizzati appena possibile dopo la raccolta. Può essere utile congelare i campioni non sterili da conservare o spedire prima del test. I campioni con presunte basse concentrazioni di endotossina devono essere testati per valutare l'eventuale perdita di endotossina durante la conservazione.

Procedura di analisi

Reagenti per analisi forniti con Pyrochrome

1. *Pyrochrome* (vedere la descrizione riportata nelle precedenti sezioni "Reagente" e "Procedura di ricostituzione").
2. *Tampone di ricostituzione del Pyrochrome.* Usare il tampone per la ricostituzione del Pyrochrome come descritto in precedenza.
3. *Endotossina standard di controllo* (CSE) – Solo kit di diazocopulazione (CD060): ciascuna fiala di CSE contiene 10 ng. Ricostituire la CSE con il volume specificato nel Certificato di analisi (che riporta la potenza della CSE). La CSE è stata appositamente formulata per dissolversi rapidamente. Dopo aver aggiunto LRW, miscelare mediante vortex la fiala per 30-60 secondi. A questo punto la CSE è pronta per l'uso. Se non si intende usare immediatamente la soluzione, miscelare mediante vortex la fiala per 30 secondi prima dell'uso. Quindi eseguire le diluizioni idonee per ottenere le concentrazioni di endotossina desiderate. Miscelare mediante vortex tra una diluizione e l'altra. La CSE ricostituita è stabile per sette giorni quando conservata a 2-8 °C. Non congelare la CSE ricostituita.
   Ogni fiala di CSE contiene endotossina la cui attività è stata determinata rispetto all'endotossina standard di riferimento (RSE) statunitense ed è riportata nel Certificato di analisi. L'Endotoxin Reference Standard dell'USP (identico alla RSE) può essere richiesto alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.
   Nota – Il Certificato di analisi e la potenza ivi riportata si riferiscono a una combinazione specifica di lotto di Pyrochrome e CSE. Un dato lotto di CSE potrebbe esibire potenze differenti (EU/ng) quando analizzato con lotti differenti di Pyrochrome o con Pyrotell o Pyrotell-T. Analogamente, lotti differenti di CSE esibiranno molto probabilmente potenze differenti quando testati con lo stesso lotto di Pyrochrome. **Accertarsi di usare il Certificato di analisi e la potenza corretti**.
   Utilizzare la CSE per preparare concentrazioni di endotossina standard da cui costruire le curve standard, per i controlli positivi e per i controlli positivi del prodotto (controlli di interferenza). Non utilizzare questa CSE come controllo di depirogenazione.
4. *Reagenti di tipo diazoico* – Solo kit di diazocopulazione (CD060): Fiala 1a, HCl; Fiala 1, nitrito di sodio; Fiala 2, solfammato di ammonio; Fiala 3, NEDA. Ricostituire la Fiala 1 con l'intero contenuto della Fiala 1a; ricostituire la Fiala 2 con 4 mL di acqua; ricostituire la Fiala 3 con 4 mL di acqua. Vedere il punto 5 che segue per informazioni sul grado dell'acqua richiesto per l'analisi.

Reagenti per analisi non forniti con Pyrochrome

1. *Endotossina standard di controllo* (CSE). (Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo EC010). Ricostituire la CSE con il volume specificato nel Certificato di analisi (che riporta la potenza della CSE), e secondo quanto indicato nel foglio illustrativo che accompagna la confezione. Per l'uso e la conservazione dell'endotossina standard seguire le istruzioni riportate nel foglio illustrativo.
   La potenza della CSE è stata determinata rispetto all'endotossina standard di riferimento (RSE) statunitense ed è riportata nel Certificato di analisi. L'Endotoxin Reference Standard dell'USP (identico alla RSE) può essere richiesto alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. **Nota –** Il Certificato di analisi e la potenza ivi riportata si riferiscono a una combinazione specifica di lotto di Pyrochrome e CSE. Un dato lotto di CSE può esibire potenze differenti (EU/ng) quando analizzato con lotti differenti di Pyrochrome, Pyrotell o altre marche di LAL (1). Analogamente, lotti differenti di CSE esibiranno molto probabilmente potenze differenti quando testati con lo stesso lotto di Pyrochrome. **Accertarsi di usare il Certificato di analisi e la potenza corretti**.
   Usare la CSE per la preparazione delle diluizioni di endotossina standard da cui costruire le curve standard, per i controlli positivi e per i controlli positivi del prodotto (controlli di interferenza).
2. *Reagente acqua per LAL* (LRW). Può essere richiesto anche ad Associates of Cape Cod, Inc. (disponibile in contenitori di svariate capacità e configurazioni di spedizione). È consentito usare acqua sterile per preparazioni iniettabili (WFI sterile) approvata dalla USP senza agenti batteriostatici o acqua per irrigazione approvata dalla USP, entrambe comunemente reperibili in commercio, purché ne sia stata dimostrata l'idoneità per l'uso come LRW. Il limite di endotossina per la WFI sterile USP è di 0,25 EU/mL; pertanto la WFI sterile potrebbe contenere livelli rilevabili di endotossina e non essere idonea all'uso.
   Per certificare che l'acqua sia idonea all'uso come LRW, analizzarla come un campione con un controllo positivo del prodotto (vedere il punto 1.c. della sezione "Controlli"). Usare LRW certificata per eseguire le diluizioni degli standard e per preparare i controlli positivi (vedere i punti 1.a. e 1.b. della sezione "Controlli"). Costruire una curva standard basandosi sui tempi di inizio o sui dosaggi del metodo endpoint per gli standard. Il coefficiente di correlazione deve essere almeno 0,980 (valore assoluto). La concentrazione di endotossina dell'acqua in esame può essere stimata estrapolando la curva standard al di sotto della concentrazione più bassa di endotossina e deve essere considerevolmente inferiore a quella dello standard più basso. Inoltre, la concentrazione di endotossina del controllo positivo del prodotto deve essere compresa tra ± 25% di quella di un controllo positivo.
3. *Tampone Glucashield™*. Può essere richiesto alla Associates of Cape Cod, Inc. (numero di catalogo GB051) e può essere utilizzato al posto del tampone di ricostituzione del Pyrochrome per eliminare l'interferenza ad opera dei (1,3)-Beta-D-glucani.
4. *Acido acetico al 50%* (per il metodo endpoint). Prepararlo aggiungendo un volume di acido acetico glaciale ad un volume equivalente di acqua distillata o trattata mediante osmosi inversa. Volendo, si può anche utilizzare LRW (vedere il punto 2. qui sopra), ma l'analisi non lo richiede.
5. *Acqua* (solo per la ricostituzione dei reagenti di tipo diazoico). È accettabile qualsiasi fonte di laboratorio che fornisca acqua distillata (inclusa LRW), acqua deionizzata o acqua trattata mediante osmosi inversa. Quest'acqua non deve essere necessariamente esente da endotossina, in quanto è utilizzata unicamente per il metodo diazoico.

Materiali e apparecchiature

1. *Micropiastre.* Micropiastre coperte, a 96 pozzetti (disponibili su richiesta presso la Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo CA961). Le piastre devono essere certificate o analizzate per escludere la contaminazione da endotossine e/o glucani e non devono causare né inibizione né attivazione.
2. *Provette di reazione.* Per i dosaggi endpoint si possono utilizzare anche provette per coltura in vetro borosilicato, depirogenate, da 10 x 75 mm (disponibili su richiesta presso la Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo TB050).
3. *Lettore ottico* in grado di eseguire letture a 405 nm, o a 540-550 nm per il metodo di diazocopulazione. Per il metodo cinetico, utilizzare un lettore ottico per incubazione.
   Per il metodo endpoint, usare un apposito lettore per leggere le micropiastre, oppure, se si esegue l'analisi in provette, uno spettrofotometro con cuvette idonee.
4. *Incubatore* in grado di mantenere la temperatura a 37±1 °C (necessario solo per i metodi endpoint). Si consiglia l'uso di un incubatore con blocco a secco per le microspiastre (o le provette, a seconda del caso). (Per il metodo endpoint con provette per analisi si può utilizzare un bagnomaria.) L'incubatore deve garantire una distribuzione uniforme del calore.
5. *Supporto portaprovette* per l'inserimento e/o l'incubazione delle provette di diluizione e di reazione.
6. *Pipette*, micropipette con relativi puntali o pipettatori a ripetizione con cilindri delle siringhe in plastica. Si consiglia di usare pipette e puntali monouso esenti da endotossine e glucani, che interferiscono con l'analisi. La Associates of Cape Cod, Inc. offre la linea di prodotti Pyroclear®, certificati esenti da endotossine e glucani interferenti.
7. *Miscelatore di tipo vortex.*
8. *Parafilm M*® (American National Can™). In condizioni normali, il lato a contatto con il rivestimento in carta è esente da endotossina rilevabile.
9. *Provette per analisi* esenti da endotossina interferente, di capacità adeguata per eseguire le diluizioni dello standard di endotossina o del campione da analizzare. Per informazioni sui contenitori idonei per le diluizioni, vedere "Raccolta e preparazione dei campioni".
10. *Stufa ad aria calda* in grado di raggiungere una temperatura di almeno 250 °C per la depirogenazione della vetreria. I cicli di depirogenazione adottati comunemente prevedono la permanenza di tutti gli articoli per almeno 30 minuti ad una temperatura minima di 250 °C (2, 14, 15).

Controlli

I controlli servono a garantire la validità del test. Le metodiche da seguire sono definite in dettaglio dalla FDA (1) e dalla USP (2).

1. **Controlli di endotossina.**
   a. **Serie di standard di endotossina**. Approntare per ciascun test una serie di diluizioni preparate al momento partendo dalla soluzione di endotossina base. Non usare diluizioni preparate in precedenza e conservate, se non dopo avere confermato la stabilità di quel range di concentrazioni. Eseguire le diluizioni in una serie geometrica per ottenere il range di concentrazioni di endotossina necessario. Per i metodi endpoint si consigliano diluizioni doppie; per il metodo cinetico si possono usare diluizioni maggiori. La concentrazione più bassa di endotossina in qualsiasi serie di standard costituisce il limite di rilevamento di quel particolare test ed è designata λ (**Nota:** con Pyrochrome è possibile un limite di rilevamento di 0,005 EU/mL). Per ottenere il range di standard necessario ai fini dell'analisi, utilizzare quante meno diluizioni possibile con volumi pipette appropriati per massimizzare l'accuratezza. Le diluizioni possono essere eseguite in provette in vetro o plastica idonea o direttamente in una micropiastra. Le concentrazioni massime rilevate con Pyrochrome sono metodo dipendenti. In caso di dubbi, fare riferimento ai tempi di incubazione indicati con Pyrochrome.
   b. **È necessario includere un controllo positivo** (una singola concentrazione di endotossina standard) se la serie di standard (vedere il punto a. qui sopra) non viene preparata allo stesso modo dei controlli positivi del prodotto (vedere il punto c. che segue). La concentrazione di endotossina del controllo positivo deve essere uguale a quella di uno standard al centro della curva standard. Una concentrazione 4λ è appropriata per le curve standard costruite in base a 4, 5 o 6 diluizioni doppie di endotossina standard. Un valore di 0,5 EU/mL è appropriato per i controlli positivi inclusi in una serie di standard che comprende concentrazioni di 0,005; 0,05; 0,5; 5 e 50 EU/mL. Se in un test non è inclusa una serie di standard, è necessario includere un controllo positivo per verificare che per il calcolo delle concentrazioni di endotossina sia corretto usare i parametri di una curva standard precedente (archiviata). Per informazioni dettagliate, fare riferimento alle linee guida della FDA (1), sotto "Routine Testing of Drugs by the LAL Test".
   c. I controlli positivi del prodotto sono controlli di inibizione/attivazione e consistono nel campione o diluizione del campione ai quali si aggiunge endotossina standard. La concentrazione dell'endotossina aggiunta nel campione in esame deve essere uguale a quella del controllo positivo. Fare riferimento al punto b. qui sopra per la selezione della concentrazione di endotossina appropriata per il controllo positivo del prodotto. L'endotossina aggiunta viene frequentemente denominata "spike".
2. **Controlli negativi.**
   I controlli negativi con LRW devono essere inclusi in ciascun test.

Preparazione dei campioni – Determinazione della diluizione del test

Se in precedenza è stato messo a punto un protocollo di analisi per il tipo di campione in esame, eseguire la diluizione necessaria per il dosaggio e continuare come indicato nella sezione "Esecuzione del test". Se invece non esiste un protocollo già definito per il tipo di campione in esame, eseguire una serie di diluizioni decuple del campione. Non superare di un fattore maggiore di 10 la massima diluizione valida del prodotto. Per la spiegazione e il calcolo della massima diluizione valida (MVD) e della minima concentrazione valida (MVC), fare riferimento alla sezione "Limiti della procedura" qui sotto, o alle linee guida della FDA (1). Preparare le diluizioni appropriate di tutti i campioni con un controllo positivo del prodotto per ciascun campione.

Esecuzione del test

Per ottenere risultati soddisfacenti, è necessario adottare una tecnica uniforme. Analizzare tutti i controlli e i campioni come minimo in duplicato. Un problema ricorrente degli incubatori per micropiastre è costituito dalle temperature più basse che si registrano in corrispondenza dei bordi esterni. Pertanto, potrebbe essere necessario evitare l'uso dei pozzetti esterni al fine di eliminare tale problema e/o il rischio di contaminazione dovuta alla manipolazione della piastra.

1. Preparare la strumentazione per il test come necessario. In un sistema automatizzato, questo comporta generalmente l'immissione dei descrittori dei campioni, l'impostazione dei parametri di analisi e l'accensione dell'incubatore, che va impostato a 37 °C.
2. Dispensare nel contenitore di reazione il volume appropriato di campione (controllo negativo, standard di endotossina, campione o controllo positivo del prodotto) per ottenere un rapporto di 1:1 quando si aggiunge Pyrochrome (vedere il punto 3. qui sotto). Usare 0,05 mL per uno qualsiasi dei metodi (cinetico, endpoint o di diazocopulazione). In alternativa, per i metodi cinetico ed endpoint, si possono usare 0,1 mL.
3. Aggiungere Pyrochrome come appropriato per il metodo che si intende adottare.
   a. Per una micropiastra, dispensare Pyrochrome quanto più rapidamente possibile in tutti i campioni e miscelarlo per 5-30 secondi. Collocare la piastra su un blocco dell'incubatore (per un test endpoint) o in un lettore di piastre per incubazione (per un test cinetico). Il volume di Pyrochrome dispensato è uguale al volume del campione (vedere il punto 2. qui sopra; generalmente 0,05 mL, anche se nei metodi cinetico ed endpoint si possono usare 0,1 mL). Notare che i tempi di incubazione consigliati si riferiscono a volumi di 0,05 mL.
   Una miscelazione non adeguata è spesso causa di risultati insoddisfacenti dell'analisi. Per dispensare agevolmente Pyrochrome utilizzare un pipettatore a ripetizione. Prestare attenzione a non contaminare la fiala di Pyrochrome quando si preleva il reagente.
   b. Per i metodi che prevedono l'impiego di cuvette o provette di reazione singole, i tempi di reazione in ciascuna provetta sono di importanza critica. In ciascun contenitore di reazione, a turno aggiungere Pyrochrome, miscelare per circa 2 secondi, quindi collocare il contenitore nel dispositivo di incubazione.
4. Leggere il test.
   a. Per il metodo cinetico, lasciare incubare tutti i campioni per un periodo di tempo considerevolmente più lungo del necessario affinché la concentrazione più bassa di endotossina standard raggiunga l'OD_{405} di inizio. I sistemi di analisi automatizzati normalmente concludono il test dopo un periodo predeterminato. In caso di dubbi, fare riferimento ai tempi di incubazione consigliati.
   b. Per il metodo endpoint occorre rispettare rigorosamente i tempi di incubazione, estrarre la piastra o le provette di reazione dall'incubatore, arrestare la reazione con acido acetico al 50% (un volume sufficiente a dare una concentrazione finale di acido acetico pari al 10%; usare 0,025 mL per volumi di campione/Pyrochrome di 0,05 mL) e misurare la densità ottica (OD) in uno spettrofotometro o lettore di piastre (a seconda dei casi) a 405 nm. Il test deve essere predisposto e letto in modo che il tempo di incubazione di ciascun campione sia lo stesso (entro ±30 secondi). Il periodo di incubazione dipende dal range di concentrazioni di endotossina desiderato e probabilmente varia con lotti differenti di Pyrochrome. Potrebbe essere necessario svolgere test preliminari per determinare il periodo di incubazione corretto. In caso di dubbi, fare riferimento ai tempi di incubazione consigliati.
   c. Per il metodo endpoint di tipo diazoico, estrarre dall'incubatore le provette di reazione o la piastra e arrestare la reazione con 0,05 mL di nitrito di sodio ricostituito con HCl (soluzione 1). Aggiungere 0,05 mL di soluzione 2 (solfammato di ammonio) in ciascun pozzetto di reazione. Aggiungere 0,05 mL di soluzione 3 (NEDA) in ciascun pozzetto. Dovrebbe svilupparsi immediatamente un'intensa colorazione (magenta). Leggere il test a 540-550 nm. Il test deve essere predisposto e letto in modo che il tempo di incubazione di ciascun campione sia lo stesso (entro ±30 secondi). Il periodo di incubazione dipende dal range di concentrazioni di endotossina desiderato e probabilmente varia con lotti differenti di Pyrochrome. Potrebbe essere necessario svolgere test preliminari per determinare il periodo di incubazione corretto.

Risultati

1. **Calcoli preliminari.**
   a. Per il metodo cinetico, determinare il tempo necessario ai campioni per raggiungere una particolare soglia di densità ottica (in genere 0,03 unità OD), dopo avere effettuato eventuali correzioni dei dati. Le letture della densità ottica devono essere relative a una lettura iniziale pari a zero unità OD. Molti lettori di piastre sono dotati di pacchetti software in grado di eseguire questi calcoli. Il tempo necessario per raggiungere il valore OD viene definito tempo di inizio.
2. **Costruzione di una curva standard.**
   a. Per il metodo cinetico, costruire una curva standard per regressione del logaritmo del tempo di inizio sul logaritmo della concentrazione di endotossina per gli standard. L'equazione della retta di regressione descrive la curva standard.
   b. Per il metodo endpoint, costruire una curva standard tracciando le letture della densità ottica in funzione delle concentrazioni di endotossina standard.
3. **Calcolo delle concentrazioni di endotossina.**
   Calcolare le concentrazioni di endotossina di tutti i campioni (inclusi gli standard e i controlli) utilizzando l'equazione di una linea retta:

$$Y = aX + b$$

dove:

Y = logaritmo del tempo di inizio (metodo cinetico) o densità ottica (metodo endpoint)
X = logaritmo della concentrazione di endotossina (metodo cinetico) o concentrazione di endotossina (metodo endpoint)
a = pendenza della linea
b = l'intercetta sull'asse Y

Interpretazione

1. Perché un test sia considerato valido, la concentrazione di endotossina dei controlli negativi (stimata mediante estrapolazione della curva standard) deve essere considerevolmente inferiore a quella dello standard più basso.
2. Il coefficiente di correlazione della curva standard incluso con il test deve avere un valore assoluto maggiore di 0,980.
3. La concentrazione media di endotossina misurata riscontrata nei controlli positivi (per la verifica di una curva archiviata) deve rientrare nel 25% della concentrazione nominale. Ne consegue che, se il risultato del controllo positivo è 0,125 EU/mL, la concentrazione misurata deve essere compresa tra 0,09375 e 0,15625 EU/mL.
4. Le concentrazioni di endotossina possono essere refertate solo per il range di concentrazione di endotossina standard dalla più bassa alla più alta. I risultati dei campioni che cadono all'esterno di questo range devono essere refertati come inferiori alla concentrazione standard più bassa (non rilevabile) o superiori alla concentrazione standard più alta.
   Per il metodo endpoint, le concentrazioni valide di endotossina possono essere calcolate solo partendo dai valori OD che si trovano sulla porzione lineare della curva standard.
5. Per dimostrare che il campione non interferisce in maniera significativa con la reazione LAL/endotossina, la concentrazione misurata di endotossina del controllo positivo del prodotto deve rientrare tra il 50 e il 200% della concentrazione nominale dell'endotossina aggiunta ('spike'). Prima di determinare se il recupero dello spike rientra in questi limiti, sottrarre la concentrazione di endotossina misurata nel campione (non addizionato). Ad esempio, per essere considerata esente da interferenza significativa, la concentrazione misurata di endotossina di un controllo positivo del prodotto con 0,125 EU/mL (dopo sottrazione dell'eventuale endotossina nel campione non addizionato) deve rientrare nel range compreso tra 0,0625 e 0,25 EU/mL (dal 50 al 200% di 0,125 EU/mL). Se la concentrazione misurata di endotossina nel campione non addizionato è di 0,028 EU/mL e quella nel controllo positivo del prodotto è di 0,163 EU/mL, l'endotossina attribuibile allo spike è 0,163 – 0,028 = 0,135 EU/mL. Tale valore rientra nel range e, a condizione che vengano soddisfatti gli altri requisiti del test, l'analisi del campione deve ritenersi valida.

Limiti della procedura

La procedura è limitata dal grado di inibizione o di attivazione dimostrato dal campione in esame. Se la procedura non può essere convalidata (1, 2) a una concentrazione del campione superiore alla minima concentrazione valida (MVC), il test LAL non può essere usato al posto del test dei pirogeni della USP. La MVC è calcolata come segue:

$$MVC = \frac{(\lambda)\ (\text{dose del campione})}{(\text{limite di tolleranza dell'endotossina})}$$

dove λ è in EU/mL, la dose del campione è in unità per kg di peso corporeo e il limite di tolleranza dell'endotossina è in EU/kg.

La massima diluizione valida (MDV) è la diluizione del campione contenente l'MVC (1). Viene calcolata dividendo la concentrazione iniziale del campione per l'MVC.

Il limite di tolleranza dell'endotossina è di 0,2 EU/kg per i farmaci somministrati per via endotracheale e di 5 EU/kg per quelli somministrati per tutte le altre vie parenterali. Il limite per i dispositivi medici è espresso per mL di un volume di estrazione o di risciacquo ottenuto nel modo descritto nella USP (16) in base ai limiti relativi ai dispositivi. Per i dispositivi non a contatto con il liquido cerebrospinale, il limite è di 20 EU per dispositivo; per i dispositivi a contatto con questo liquido, il limite è di 2,15 EU per dispositivo. Il limite per i presidi liquidi è lo stesso che per i farmaci, come indicato nelle linee guida della FDA (1).

Alcune proteasi seriniche (es. tripsina, fattori ematici attivati) generano un risultato falso positivo se prima dell'analisi non vengono denaturate mediante trattamento termico. I materiali di colore giallo come il siero animale, l'albumina e il plasma possono interferire con il dosaggio cromogenico pNA. Per questi prodotti, utilizzare il dosaggio di diazocopulazione (n. di catalogo ACC CD060). Anche la presenza di torbidità eccessiva in un campione può interferire con il test, a meno che la torbidità possa essere sottratta dal controllo negativo (bianco), o il campione venga trattato in modo tale da eliminare la torbidità.

Valori previsti

L'endotossina presente nei campioni può essere calcolata entro il range delle concentrazioni di endotossina standard usate per costruire la curva standard. Se si rende necessario diluire il campione per superare qualsiasi eventuale inibizione o attivazione, la più piccola quantità di endotossina rilevabile verrà incrementata di conseguenza. I materiali di origine biologica possono contenere livelli misurabili di endotossina anche dopo essere stati sottoposti a purificazione biochimica. L'acqua ottenuta mediante distillazione, osmosi inversa o ultrafiltrazione può contenere una quantità di endotossina inferiore a quella rilevabile, a condizione che il processo di purificazione funzioni correttamente e che l'acqua non venga contaminata dopo la produzione.

Bibliografia

1. Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, revisione corrente USP, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky e T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. **27**:947-951.
4. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus, Callinectes hastatus,* and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular **43**:4-5.
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.
6. Levin, J. e F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. **115**:337-345.
7. Levin, J. e F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. **19**:186-197.
8. 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.
9. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa e K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. **81**:1567-1569.
10. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus **27**:13-18.
11. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin e T. J. Novitsky (ed.), Alan R. Liss, Inc., NY.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. In: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.
13. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner e H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy **22**:417-419.
14. Tsuji, K. e S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. **36**:710-714.
15. Sweet, B. H. e J. F. Huxsoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
16. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, capitolo <161>, USP, revisione corrente, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Il nostro personale specializzato sarà lieto di spiegare gli aspetti pratici e teorici del test LAL. Non esitate a contattarci per qualsiasi informazione sull'uso di Pyrochrome. Sostituiremo tutti i prodotti con rendimento non conforme alle specifiche; prima di restituire i prodotti difettosi, vi preghiamo di chiamare il Servizio assistenza clienti.

Español

LISADO DE AMEBOCITOS DE *LIMULUS*

PYROCHROME®

para la detección y cuantificación de endotoxinas de bacterias gramnegativas (lipopolisacáridos)

La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), utilizada de acuerdo con las pautas de la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense (1), puede sustituir a la prueba de pirógenos (prueba de la tularemia) de la U.S. Pharmacopeia (USP) para el control del producto terminado de «fármacos inyectables para humanos (incluidos los productos biológicos), fármacos inyectables para animales y productos sanitarios». La prueba del LAL está recomendada para la cuantificación de endotoxinas en materias primas utilizadas en procesos de producción, incluida el agua, y para la vigilancia de las concentraciones de endotoxinas durante dichos procesos. La Bacterial Endotoxins Test de la USP (2) es la prueba del LAL oficial a la que se hace referencia en monografías específicas de la USP.

Resumen de la prueba

El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). En presencia de endotoxinas, ciertos factores presentes en el LAL se activan en una cascada proteolítica que produce la escisión de un sustrato peptídico artificial incoloro presente en el LAL Pyrochrome. La escisión proteolítica del sustrato libera p-nitroanilina (pNA), que es amarilla y absorbe a 405 nm. La prueba se realiza añadiendo un volumen de Pyrochrome a un volumen de muestra e incubando la mezcla de reacción a 37 °C. Cuanto mayor sea la concentración de endotoxinas de la muestra, más rápido se producirá la pNA. Hay dos formas de utilizar el Pyrochrome para cuantificar la concentración de endotoxinas (3).

En el método cinético se determina el tiempo que se tarda en alcanzar una absorbancia específica a 405 nm (el tiempo de activación). Cuanto mayor sea la concentración de endotoxinas, menor será el tiempo de activación. El análisis requiere instrumental especializado para incubar varias muestras a temperatura controlada (normalmente 37 °C) y para obtener lecturas de la densidad óptica a intervalos regulares. A continuación puede representarse gráficamente el logaritmo del tiempo de activación en función del logaritmo de la concentración de endotoxina estándar para obtener curvas estándares con las que se pueden calcular las concentraciones de endotoxinas de las muestras.

Por otra parte, el método cromogénico de criterio de valoración consiste en medir la cantidad de pNA liberada después de un periodo de incubación fijo. Las concentraciones de endotoxinas de las muestras se determinan a partir de una curva estándar, que es una representación gráfica de las medidas de la densidad óptica en función de la concentración conocida de endotoxina estándar. En los casos de muestras que absorban a 405-410 nm puede emplearse una modificación de diazoacoplamiento. En este método, la pNA (formada durante el método cromogénico de criterio de valoración) se hace reaccionar con nitrito en HCl y, a continuación, con N-(1-naftil)-etilenediamina (NEDA) para obtener un derivado diazoado magenta que absorbe a un intervalo de 540-550 nm.

Los métodos de LAL Pyrochrome son rápidos, específicos, fáciles de utilizar y muy sensibles. El límite de detección depende del método y el instrumental empleados, y puede llegar a tener una sensibilidad de 0,005 unidades de endotoxinas (UE) por mL.

Historia y principio biológico

Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1885 (4). En los años cincuenta del siglo XX, en el Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts (EE.UU.), Bang descubrió que las bacterias gramnegativas provocan la coagulación de la sangre de *Limulus* (5). Posteriormente, Levin y Bang determinaron que la reacción es enzimática y que las enzimas se encuentran en gránulos de los amebocitos (6, 7). Dichos autores demostraron que la coagulación la inicia un componente estructural exclusivo de la pared celular bacteriana, denominado endotoxina o lipopolisacárido (8). Actualmente se sabe que la reacción consiste en una cascada de pasos de activación enzimática que terminan con la escisión del péptido, que es coagulógeno. El producto insoluble de la escisión del coagulógeno (coagulina) se une por interacción iónica. Si se forma suficiente coagulina, aparece turbidez, seguida de la formación de un coágulo de gel. Esta interacción es la base de un análisis de endotoxinas denominado prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). En 1977, investigadores japoneses descubrieron que el LAL activado por endotoxinas también escindía pequeños péptidos cromogénicos que contenían un lugar de escisión de aminoácidos similar al del coagulógeno y el cromóforo paranitroanilina (9). La escisión provoca la liberación de pNA, que es amarilla y absorbe luz a 405 nm. En esta adaptación cromogénica del análisis de LAL, la concentración de coagulógeno se reduce mediante dilución para minimizar las interferencias producidas al añadir sustrato cromogénico al LAL. Así, al añadir endotoxinas al LAL cromogénico se forma un color, en vez de turbidez o un coágulo de gel. En todas las versiones del análisis de LAL (coágulo de gel, turbidimétrico y cromogénico), cuanto mayor es la cantidad de endotoxinas presente, más rápido se desarrolla el criterio de valoración (coágulo de gel, turbidez o color). En la literatura científica actual puede obtenerse más información sobre los tipos de análisis de LAL, así como sobre su reacción y sus aplicaciones (10, 11, 12).

Reactivo

El Pyrochrome se suministra en forma liofilizada, envasado en frascos de 3,2 mL. Contiene un extracto acuoso de amebocitos de *Limulus polyphemus*, dextrano (estabilizador), EDTA, $CaCl_2$, $MgCl_2$, tampón y sustrato cromogénico (Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroanilida).

El Pyrochrome no tiene una sensibilidad específica asignada. La sensibilidad en un análisis dado (designada λ) es la concentración de endotoxinas más baja utilizada para elaborar la curva estándar. La sensibilidad máxima, λ, del Pyrochrome es de 0,005 UE/mL.

El Pyrochrome está indicado solamente para procedimientos de diagnóstico *in vitro*, y no para el diagnóstico de endotoxemia en humanos. La toxicidad del Pyrochrome no se ha determinado. Sin embargo, el contacto prolongado o reiterado del LAL con la piel ha producido reacciones alérgicas de tipo I en algunas personas (13), por lo que debe tenerse cuidado al manipular el Pyrochrome.

Procedimiento de reconstitución:

1. Dé unos golpecitos en el frasco de Pyrochrome para hacer que el LAL suelto caiga al fondo. Levante el tapón gris para deshacer el vacío. No contamine la boca del frasco. Retire y deseche el tapón; no inyecte a través de él ni lo reutilice. Una pequeña cantidad de LAL remanente en el tapón no afectará a la prueba.
2. Reconstituya el Pyrochrome con 3,2 mL de tampón de Pyrochrome o con un tampón compatible de Associates of Cape Cod, Inc. La pella tardará algunos minutos en disolverse en la solución, por lo que deberá rehidratar el producto al menos 5 minutos antes de su uso. Agite el frasco para asegurar la homogeneidad, pero evite hacerlo con demasiada brusquedad, ya que podría producir exceso de espuma y pérdida de sensibilidad. Cubra el frasco con Parafilm M® y consérvelo frío (a entre 2 y 8 °C o sobre hielo) cuando no lo esté utilizando. El Pyrochrome debe utilizarse en las 8 horas posteriores a su reconstitución.

Condiciones de almacenamiento

El Pyrochrome liofilizado es relativamente estable y, si se almacena adecuadamente, mantendrá toda su actividad hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Almacene el producto a entre 2 y 8 °C. Las temperaturas de más de 37 °C pueden producir un rápido deterioro del Pyrochrome liofilizado, que se manifiesta por la pérdida de sensibilidad y por un marcado amarillo del producto. El Pyrochrome se suministra en recipientes aislados para protegerlo de las temperaturas altas. Antes de su reconstitución, el Pyrochrome es sensible a la luz y debe almacenarse en un lugar oscuro.

Por lo general, el Pyrochrome reconstituido es transparente y ligeramente opalescente. Es posible que algún lote muestre una ligera turbidez uniforme. La presencia de pequeñas fibras o hebras no indica contaminación ni afecta a la actividad; no obstante, la precipitación floculante o un marcado color amarillo sí son signos de deterioro.

El Pyrochrome reconstituido es menos estable que el producto liofilizado; los frascos pueden mantenerse hasta 8 horas a entre 2 y 8 °C (o sobre hielo). El Pyrochrome reconstituido no puede congelarse.

Recogida y preparación de las muestras

Las muestras deben recogerse asépticamente en recipientes que no contengan endotoxinas detectables. Para minimizar la adsorción de endotoxinas a las superficies de los recipientes, se recomienda utilizar recipientes de vidrio despirogenados reutilizables o recipientes de poliestireno o tereftalato de polietileno (PET) desechables estériles. No todos los recipientes de plástico están libres de endotoxinas detectables. Además, las sustancias extraíbles de algunos plásticos pueden interferir en la prueba del LAL. La aceptabilidad del material de laboratorio debe comprobarse seleccionando al azar algunos recipientes de un lote, enjuagándolos con una pequeña cantidad de agua de reactivo de LAL (ARL) a temperatura ambiente durante una hora y analizando el producto del enjuague como si fuera una muestra. El producto del enjuague debe contener una concentración de endotoxinas muy inferior a la concentración del estándar más bajo que se vaya a utilizar. Además, el producto del enjuague no debe inhibir ni potenciar la prueba, lo que puede comprobarse determinando la recuperación obtenida de una cantidad conocida de endotoxinas añadida.

El pH de la mezcla de reacción (un volumen de muestra o de dilución de muestra mezclado con el mismo volumen de Pyrochrome) debe estar entre 6 y 8. Ajuste el pH de la muestra con HCl, NaOH o tampón (sin endotoxinas detectables). Diluya el HCl o el NaOH concentrados con ARL y utilícelos a normalidades que no produzcan una dilución excesiva de la muestra que se vaya a analizar. Si al ajustar el pH se forma un precipitado en la muestra, diluya ésta (sin sobrepasar la DMV, consulte el apartado «Limitaciones del procedimiento») antes de ajustar el pH. No ajuste el pH del agua ni de las soluciones salinas no tamponadas. Tenga en cuenta que la dilución por sí sola puede solucionar los problemas de pH.

Las sustancias que desnaturalizan las proteínas, que quelan iones, que se unen a las endotoxinas o que alteran el estado hidrófobo de las endotoxinas pueden interferir en la prueba. La recuperación de una cantidad de endotoxinas considerablemente superior o inferior a la esperada tras añadir una cantidad conocida de endotoxina estándar a la muestra (consulte «Limitaciones del procedimiento») indica la presencia de interferencias. En la mayoría de los casos, la dilución de la muestra reducirá la concentración y la actividad de las sustancias interferentes sin invalidar los resultados de la prueba. Para obtener información sobre los controles y los niveles de dilución adecuados, consulte «Procedimiento analítico».

Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible después de su recogida. Puede ser conveniente congelar las muestras no estériles que se vayan a conservar o a enviar antes de analizarlas. Las muestras que se espere que tengan concentraciones bajas de endotoxinas deben analizarse para comprobar si ha habido pérdida de endotoxinas durante el periodo de almacenamiento.

Procedimiento analítico

Reactivos analíticos suministrados con el Pyrochrome

1. *Pyrochrome* (descrito en los apartados «Reactivo» y «Procedimiento de reconstitución» anteriores).
2. *Tampón de reconstitución del Pyrochrome.* Utilice el tampón para reconstituir el Pyrochrome de la forma descrita más arriba.
3. *Endotoxina estándar de control* (EEC), sólo en el kit Diazo (CD060): Cada frasco de EEC contiene 10 ng. Reconstituya la EEC con el volumen especificado en el certificado de análisis (C de A, en el que se indica la potencia de la EEC). La fórmula de la EEC se ha diseñado especialmente para que se disuelva con rapidez. Tras añadir ARL, agite en vórtex el frasco de 30 a 60 segundos. La EEC estará entonces lista para utilizarse. Si no se utiliza inmediatamente, agite en vórtex el frasco durante 30 segundos. A continuación, prepare las diluciones adecuadas para obtener las concentraciones de endotoxinas deseadas. Agite en vórtex los frascos entre una dilución y otra. La EEC reconstituida es estable durante siete días si se almacena a entre 2 y 8 °C. No congele la EEC reconstituida.
   Cada frasco de EEC contiene endotoxinas con una actividad, especificada en el C de A, determinada con respecto a la endotoxina estándar de referencia (EER) estadounidense. El Endotoxin Reference Standard de la USP (idéntico a la EER) puede adquirirse a la U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.
   Nota: El C de A y la potencia especificada en él son específicos de la combinación de un lote de Pyrochrome y uno de EEC. Un lote determinado de EEC puede mostrar diferentes potencias (UE/ng) si se analiza con diferentes lotes de Pyrochrome, o con Pyrotell o Pyrotell-T. De la misma forma, es probable que diferentes lotes de EEC muestren diferentes potencias al analizarlos con un mismo lote de Pyrochrome. **Asegúrese de utilizar el C de A y la potencia correctos.**
   Utilice la EEC para preparar concentraciones de endotoxina estándar a fin de elaborar curvas estándares a partir de ellas, para los controles positivos y para los controles de productos positivos (denominados también controles de interferencias). No utilice esta EEC como control de despirogenación.
4. *Diazorreactivos*, sólo en el kit Diazo (CD060): Frasco 1a, HCl; frasco 1, nitrito de sodio; frasco 2, sulfamato de amonio; frasco 3, NEDA. Reconstituya el frasco 1 con todo el contenido del frasco 1a, reconstituya el frasco 2 con 4 mL de agua y reconstituya el frasco 3 con 4 mL de agua. Para obtener el tipo de agua necesario, consulte el punto 5 siguiente.

Reactivos analíticos no suministrados con el Pyrochrome

1. *Endotoxina estándar de control* (EEC). (Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo EC010). Reconstituya la EEC con el volumen especificado en el certificado de análisis (C de A, en el que se indica la potencia de la EEC) y de la forma descrita en el prospecto del envase. Siga las instrucciones del prospecto para utilizar y almacenar la endotoxina estándar.
   La potencia de la EEC se ha determinado con respecto a la endotoxina estándar de referencia (EER) estadounidense, y está especificada en el C de A. El Endotoxin Reference Standard de la USP (idéntico a la EER) puede adquirirse a la U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. **Nota:** El C de A y la potencia especificada en él son específicos de la combinación de un lote de Pyrochrome y uno de EEC. Un lote determinado de EEC puede mostrar diferentes potencias (UE/ng) si se analiza con diferentes lotes de Pyrochrome, Pyrotell u otras marcas de LAL (1). De la misma forma, es probable que diferentes lotes de EEC muestren diferentes potencias al analizarlos con un mismo lote de Pyrochrome. **Asegúrese de utilizar el C de A y la potencia correctos.**
   Utilice la EEC para preparar diluciones de endotoxina estándar a fin de elaborar curvas estándares a partir de ellas, para los controles positivos y para los controles de productos positivos (denominados también controles de interferencias).
2. *Agua de reactivo de LAL* (ARL). Las fuentes recomendadas para adquirirla incluyen Associates of Cape Cod, Inc. (hay varios tamaños y configuraciones de envase disponibles). Puede utilizarse agua USP para inyectables estéril (API estéril) comercial sin bacteriostáticos o agua USP para irrigación, siempre y cuando se haya comprobado que sean aceptables como ARL. El límite de endotoxinas del API USP estéril es de sólo 0,25 UE/mL, por lo que el API estéril puede contener endotoxinas detectables y ser inadecuada para utilizarse en esta prueba.
   Para certificar que un agua es aceptable como ARL, analícela como si fuera una muestra con un control de producto positivo (consulte el punto 1.c. del apartado «Controles»). Utilice ARL certificada para diluir los estándares y para preparar los controles positivos (consulte los puntos 1.a. y 1.b. de «Controles»). Elabore una curva estándar a partir de los tiempos de activación o de los análisis del criterio de valoración de los estándares. El coeficiente de correlación debe ser de al menos 0,980 (valor absoluto). La concentración de endotoxinas del agua que se esté analizando puede calcularse mediante extrapolación de la curva estándar por debajo de la concentración de endotoxinas más baja, y debe ser significativamente inferior a la del estándar más bajo. Además, la concentración de endotoxinas del control de producto positivo debe estar dentro del intervalo del ±25% de la concentración de un control positivo.
3. *Tampón Glucashield™*. Puede adquirirse a Associates of Cape Cod, Inc. (número de catálogo GB051) y utilizarse en lugar del tampón de reconstitución de Pyrochrome para evitar las interferencias de los (1,3)-beta-D-glucanos.
4. *Ácido acético al 50%* (para el método de criterio de valoración). Prepárelo añadiendo un volumen de ácido acético glacial al mismo volumen de agua destilada o de agua tratada por ósmosis inversa (puede utilizarse ARL, consulte el punto 2. anterior, pero no es necesario).
5. *Agua* (solamente para la reconstitución de los reactivos diazoacopladores). Es aceptable cualquier fuente de laboratorio de agua destilada (incluida la ARL), desionizada o tratada por ósmosis inversa. Esta agua no necesita estar libre de endotoxinas, ya que sólo se utiliza para la química diazoacopladora.

Materiales y equipo

1. *Microplacas.* Microplacas de 96 pocillos cubiertas (pueden adquirirse a Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo CA961). Las placas deben estar certificadas o analizarse para tener constancia del contenido de endotoxinas y/o de la contaminación por glucanos, y no deben producir inhibición ni potenciación.
2. *Tubos de reacción.* Los análisis de criterios de valoración también pueden realizarse en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato despirogenados de 10 x 75 mm (pueden adquirirse a Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo TB050).
3. *Lector óptico* capaz de leer a 405 nm, o a 540-550 nm para el método de diazoacoplamiento. Para el método cinético, utilice un lector óptico de incubación.
   Para el método de criterio de valoración, utilice un lector de placas para leer las microplacas o bien, si realiza la prueba en tubos, un espectrofotómetro con las cubetas adecuadas.
4. *Incubadora* capaz de mantener una temperatura de 37±1 °C (necesaria solamente para los métodos de criterio de valoración). Se recomienda utilizar una incubadora de bloque seco para las microplacas (o los tubos, según corresponda). (Para el método de criterio de valoración en tubos de ensayo puede utilizarse un baño de agua). Debe comprobarse que las incubadoras distribuyan uniformemente el calor.
5. *Gradillas* para sostener y/o incubar los tubos de dilución y de reacción.
6. *Pipetas*, micropipetas con puntas de pipeta o pipetas de repetición con émbolos de jeringa de plástico. Se recomienda utilizar pipetas y puntas de pipeta desechables y libres de endotoxinas y glucanos interferentes. Associates of Cape Cod, Inc., ofrece la línea de productos Pyroclear®, con certificado de que están libres de endotoxinas y glucanos interferentes.
7. *Mezclador tipo vórtex.*
8. *Parafilm M*® (American National Can™). Por lo general, el lado que está en contacto con el papel protector está libre de endotoxinas detectables.
9. *Tubos de ensayo* libres de endotoxinas interferentes, con la capacidad adecuada para hacer diluciones de los estándares de endotoxinas o de las muestras que se desee analizar. Los recipientes adecuados para hacer las diluciones se especifican en «Recogida y preparación de las muestras».
10. *Horno de aire caliente* con capacidad para calentar hasta 250 °C como mínimo para la despirogenación del material de vidrio. Los ciclos de despirogenación utilizados comúnmente aseguran que todos los artículos que haya dentro del horno se expongan un mínimo de 30 minutos a una temperatura mínima de 250 °C (2, 14, 15).

Controles

Los controles son necesarios para garantizar la validez de las pruebas. Los procedimientos recomendados han sido detallados por la FDA (1) y la USP (2).

1. **Controles de endotoxinas.**
   a. **Serie de estándares de endotoxinas**. Prepare un nuevo conjunto de diluciones para cada prueba a partir de la solución madre de endotoxinas. No utilice diluciones preparadas previamente y almacenadas, a menos que haya comprobado la estabilidad de ese intervalo de concentraciones. Haga una serie geométrica de diluciones para obtener el intervalo de concentraciones de endotoxinas requerido. Para los métodos de criterio de valoración se recomienda utilizar diluciones dobles; para el método cinético pueden emplearse diluciones mayores. La concentración de endotoxinas más baja de cualquier serie de estándares es el límite de detección de esa prueba particular, y se denomina λ. (**Nota:** con Pyrochrome es posible alcanzar un límite de detección de 0,005 UE/mL). Para obtener el intervalo de estándares requerido, utilice el menor número de diluciones posible con volúmenes de pipeta adecuados para maximizar la exactitud. Las diluciones pueden hacerse en tubos de ensayo de vidrio o de plástico adecuado, o directamente en una microplaca. Las concentraciones máximas detectadas con el Pyrochrome dependen del método. Consulte los tiempos de incubación recomendados (indicados como guía) con el Pyrochrome.
   b. **Control positivo** (una sola concentración de endotoxina estándar), que debe incluirse si la serie de estándares (consulte el punto a. anterior) no se prepara de la misma forma que los controles de productos positivos (consulte el punto c. siguiente). La concentración de endotoxinas del control positivo debe ser igual a la de un estándar del centro de la curva estándar. Para las curvas estándares obtenidas a partir de 4, 5 ó 6 diluciones dobles de endotoxina estándar es adecuada una concentración de 4λ. Para los controles positivos incluidos con una serie de estándares compuesta de concentraciones de 0,005, 0,05, 0,5, 5 y 50 UE/mL sería adecuado un valor de 0,5 UE/mL. Cuando no se incluya una serie de estándares en una prueba, deberá incluirse un control positivo para comprobar si es adecuado utilizar los parámetros de una curva estándar anterior (archivada) para calcular las concentraciones de endotoxinas. Para obtener más información, consulte el apartado sobre análisis rutinarios de fármacos mediante la prueba del LAL de las pautas de la FDA (1).
   c. Los controles de productos positivos son controles de inhibición/potenciación y consisten en la muestra o la dilución de la muestra a las que se añade endotoxina estándar. La concentración de endotoxinas añadidas de la muestra que se va a analizar debe ser la misma que la del control positivo. Consulte el punto b. anterior para seleccionar la concentración de endotoxinas adecuada para el control de producto positivo. La adición de endotoxinas suele denominarse «enriquecimiento».
2. **Controles negativos.**
   Cada vez que se realice la prueba deben incluirse controles negativos de ARL.

Preparación de las muestras: determinación de la dilución de la prueba

Si se ha desarrollado previamente un protocolo analítico para el tipo de muestra que se desee analizar, prepare la dilución necesaria para el análisis y proceda de la forma indicada en «Realización de la prueba». Si no se ha desarrollado un protocolo para el tipo de muestra, haga una serie de diluciones décuplas de la muestra. No utilice diluciones de más del décuplo de la dilución máxima válida del producto. Consulte el apartado «Limitaciones del procedimiento», incluido más abajo, o las pautas de la FDA (1) para obtener información sobre la dilución máxima válida (DMV) y la concentración mínima válida (CMV), y sobre la forma de calcularlas. Prepare diluciones adecuadas de todas las muestras con un control de producto positivo para cada una.

Realización de la prueba

Para obtener resultados satisfactorios es necesario emplear una técnica uniforme. Todos los controles y las muestras deben analizarse por duplicado (como mínimo). Un problema que plantean frecuentemente las incubadoras de microplacas consiste en que los bordes exteriores presentan temperaturas más bajas. Por ello puede ser necesario evitar el uso de los pocillos exteriores para evitar el problema del calor y la posible contaminación debida a la manipulación de la placa.

1. Prepare el instrumental de la prueba como sea necesario. En un sistema automatizado, esto suele incluir la introducción de los descriptores de la muestra, el ajuste de los parámetros de la prueba y el encendido de la incubadora ajustada a 37 °C.
2. Añada al recipiente de reacción el volumen adecuado de muestra (control negativo, estándar de endotoxinas, muestra o control de producto positivo) para obtener una proporción 1:1 al añadir el Pyrochrome (consulte el punto 3., incluido más abajo). Utilice 0,05 mL para todos los métodos (cinético, de criterio de valoración o de diazoacoplamiento). Para los métodos cinético y de criterio de valoración, también puede utilizarse 0,1 mL.
3. Añada la cantidad de Pyrochrome adecuada para el método:
   a. Si se emplea una microplaca, añada Pyrochrome lo más rápidamente posible a todas las muestras y mezcle de 5 a 30 segundos. Ponga la placa sobre un bloque de incubadora (en las pruebas de criterio de valoración) o en el interior de una incubadora con lector de placas (en las pruebas cinéticas). El volumen de Pyrochrome añadido es igual al volumen de la muestra (consulte el punto 2. anterior; generalmente 0,05 mL, aunque en los métodos cinético y de criterio de valoración puede emplearse 0,1 mL). Tenga en cuenta que los tiempos de incubación recomendados se determinaron para volúmenes de 0,05 mL.
   La mezcla incorrecta es una causa frecuente de análisis insatisfactorios. El Pyrochrome puede añadirse más cómodamente con una pipeta de repetición. Tenga cuidado para evitar contaminar el frasco de Pyrochrome al extraer reactivo.
   b. Al emplear métodos que utilicen tubos o cubetas de reacción individuales, es esencial temporalizar la reacción que tiene lugar en cada tubo. Añada Pyrochrome, mezcle durante unos 2 segundos y coloque cada recipiente en el dispositivo de incubación por turnos.
4. Obtenga una lectura de la prueba.
   a. Si se emplea el método cinético, deje que la prueba continúe hasta que todas las muestras se hayan incubado mucho más tiempo del requerido para que la concentración de endotoxina estándar más baja alcance la DO_{405} de activación. Los sistemas automatizados de análisis suelen dar por terminada la prueba después de un periodo de tiempo preestablecido. Consulte los tiempos de incubación recomendados como guía.
   b. Si emplea el método de criterio de valoración, cronometre la incubación de manera precisa, retire la placa o los tubos de reacción de la incubadora, detenga la reacción con ácido acético al 50% (un volumen suficiente para obtener una concentración final de ácido acético del 10%; utilice 0,025 mL para volúmenes de muestra/Pyrochrome de 0,05 mL) y obtenga una lectura de la densidad óptica (DO) a 405 nm en un espectrofotómetro o un lector de placas (según corresponda). La configuración de la prueba y la lectura de resultados deben hacerse de forma que el tiempo de incubación de cada muestra sea el mismo (±30 segundos). El periodo de incubación depende del intervalo de concentraciones de endotoxinas deseado, y es probable que varíe con diferentes lotes de Pyrochrome. Puede ser necesario realizar pruebas preliminares para determinar el periodo de incubación correcto. Consulte los tiempos de incubación recomendados como guía.
   c. Si emplea el método de criterio de valoración con diazoacoplamiento, extraiga los tubos o la placa de reacción de la incubadora y detenga la reacción con 0,05 mL del nitrito de sodio reconstituido con HCl (solución 1). Añada 0,05 mL de la solución 2 (sulfamato de amonio) a cada pocillo de reacción. Añada 0,05 mL de la solución 3 (NEDA) a cada pocillo. Debe generarse inmediatamente un color pleno (magenta). Obtenga la lectura de la prueba a 540-550 nm. La configuración de la prueba y la lectura de resultados deben hacerse de forma que el tiempo de incubación de cada muestra sea el mismo (±30 segundos). El periodo de incubación depende del intervalo de concentraciones de endotoxinas deseado, y es probable que varíe con diferentes lotes de Pyrochrome. Puede ser necesario realizar pruebas preliminares para determinar el periodo de incubación correcto.

Resultados

1. **Cálculos preliminares.**
   a. Si emplea el método cinético, determine el tiempo que tardan las muestras en alcanzar un umbral de densidad óptica determinado (normalmente 0,03 unidades de DO) después de haber realizado las correcciones necesarias de los datos. Las lecturas de densidad óptica deben obtenerse con relación a una lectura inicial que se considera como de cero unidades de DO. Muchos lectores de placas tienen paquetes de software que realizan estos cálculos. El tiempo que se tarda en alcanzar el valor de DO se denomina tiempo de activación.
2. **Elabore una curva estándar.**
   a. Si emplea el método cinético, elabore una curva estándar mediante la regresión del logaritmo del tiempo de activación en función del logaritmo de la concentración de endotoxinas de los estándares. La ecuación de la línea de regresión describe la curva estándar.
   b. Si emplea el método de criterio de valoración, elabore una curva estándar representando gráficamente las lecturas de la densidad óptica en función de las concentraciones de endotoxina estándar.
3. **Calcule las concentraciones de endotoxinas.**
   Calcule las concentraciones de endotoxinas de todas las muestras (incluidos los estándares y los controles) empleando la ecuación de una línea recta,

$$Y = aX + b$$

donde:

Y = logaritmo del tiempo de activación (método cinético) o densidad óptica (método de criterio de valoración)
X = logaritmo de la concentración de endotoxinas (método cinético) o concentración de endotoxinas (método de criterio de valoración)
a = pendiente de la recta
b = ordenada en el origen

Interpretación

1. Para que una prueba sea válida, la concentración de endotoxinas de los controles negativos (calculada por extrapolación de la curva estándar) debe ser significativamente inferior a la de la concentración del estándar más bajo.
2. El coeficiente de correlación de la curva estándar incluida con la prueba debe tener un valor absoluto superior a 0,980.
3. La media de la concentración de endotoxinas medida de los controles positivos (para la verificación de una curva archivada) debe encontrarse a un ±25% de la concentración nominal. Así, si la concentración del control positivo es de 0,125 UE/mL, la concentración medida debe estar entre 0,09375 y 0,15625 UE/mL.
4. Sólo pueden notificarse concentraciones de endotoxinas que estén dentro del intervalo que haya entre las concentraciones más alta y más baja de endotoxina estándar. Los resultados de las muestras que tengan concentraciones que estén fuera de este intervalo deben clasificarse como inferiores a la concentración del estándar más bajo (no detectables) o superiores a la concentración del estándar más alto.
   Si emplea el método de criterio de valoración, sólo pueden calcularse concentraciones de endotoxinas válidas a partir de valores de DO que se encuentren en la parte lineal de la curva estándar.
5. Para demostrar que la muestra no interfiere significativamente con la reacción LAL-endotoxinas, la concentración de endotoxinas medida en el control de producto positivo debe estar dentro del intervalo comprendido entre el 50% y el 200% de la concentración nominal de endotoxinas añadidas durante el «enriquecimiento». Antes de determinar si el enriquecimiento se recupera dentro de estos límites, reste la concentración de endotoxinas medida en la muestra (no enriquecida). Por ejemplo, para poder considerarse libre de interferencias significativas, la concentración de endotoxinas medida en un control de producto positivo de 0,125 UE/mL (después de restar las endotoxinas presentes en la muestra no enriquecida) debe estar dentro del intervalo de 0,0625-0,25 UE/mL (del 50% al 200% de 0,125 UE/mL). Si la concentración de endotoxinas medida en la muestra no enriquecida es de 0,028 UE/mL y la del control de producto positivo es de 0,163 UE/mL, las endotoxinas atribuibles al enriquecimiento serán 0,163 – 0,028 = 0,135 UE/mL. Este valor está dentro del intervalo, por lo que, si se cumplen los demás requisitos necesarios, la prueba de la muestra es válida.

Limitaciones del procedimiento

El procedimiento está limitado por la magnitud de la capacidad de inhibición o potenciación de la muestra que se esté analizando. Si el procedimiento no puede validarse (1, 2) a una concentración de la muestra superior a la concentración mínima válida (CMV), entonces la prueba del LAL no puede sustituir a la prueba de pirógenos de la USP. La CMV se calcula de la forma siguiente:

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

donde λ está expresada en UE/mL, la dosis de la muestra está en unidades por kg de peso corporal, y el límite de tolerancia a endotoxinas está en UE/kg.

La dilución máxima válida (DMV) es la dilución de la muestra que contiene la CMV (1). Se calcula dividiendo la concentración inicial de la muestra entre la CMV.

El límite de tolerancia a endotoxinas es de 0,2 UE/kg en el caso de los fármacos intratecales, y de 5 UE/kg en el de los demás fármacos parenterales. En el caso de los productos sanitarios, el límite se expresa por mL del volumen de extracción o de producto de enjuague obtenido de la forma descrita en la USP (16) sobre la base de los límites para los productos sanitarios. El límite para los productos sanitarios que no entran en contacto con el líquido cefalorraquídeo es de 20 UE/producto, y para los que sí entran en contacto con dicho líquido, de 2,15 UE/producto. El límite para los productos sanitarios líquidos es el mismo que para los fármacos, según las pautas de la FDA (1).

Algunas proteasas de serina (p. ej., la tripsina o los factores sanguíneos activados) producirán resultados positivos falsos a menos que se desnaturalicen mediante tratamiento con calor antes del análisis. Los materiales de color amarillo, como el suero animal, la albúmina y el plasma, pueden interferir en el análisis cromogénico basado en la pNA. Para analizar estos productos, utilice el método de diazoacoplamiento (número de catálogo de ACC CD060). El exceso de turbidez de una muestra también puede interferir en la prueba, a menos que la turbidez pueda restarse del control negativo (blanco) o que la muestra pueda tratarse para eliminar la turbidez.

Valores esperados

Las endotoxinas presentes en las muestras pueden cuantificarse dentro del intervalo de concentraciones de endotoxina estándar empleado para elaborar la curva estándar. Si es necesario diluir la muestra para evitar la inhibición o la potenciación, la cantidad mínima de endotoxinas que puede detectarse aumentará proporcionalmente. Los materiales derivados de fuentes biológicas, incluso después de la purificación bioquímica, aún pueden contener concentraciones mensurables de endotoxinas. El agua obtenida por destilación, ósmosis inversa o ultrafiltración puede contener una cantidad de endotoxinas inferior a la detectable, siempre que el proceso de purificación funcione correctamente y que el agua no resulte contaminada después de la producción.

Bibliografía

1. Guideline on Validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987.
2. Bacterial Endotoxins Test, revisión actual de la USP, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky y T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. **27**:947-951.
4. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus, Callinectes hastatus,* and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular **43**:4-5.
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.
6. Levin, J. y F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. **115**:337-345.
7. Levin, J. y F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. **19**:186-197.
8. Levin, J. y F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. **115**:265-274.
9. Nakamura, S., T. Morita, S. Iwanaga, M. Niwa y K. Takahashi. 1977. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. J. Biochem. **81**:1567-1569.
10. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus **27**:13-18.
11. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin y T. J. Novitsky (eds.), Alan R. Liss, Inc., NY.
12. Gould, M. C. Endotoxin in vertebrate cell culture: Its measurement and significance, p. 125-136. En: Uses and Standardization of Vertebrate Cell Cultures, In Vitro Monograph number 5, 1984. Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD.
13. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner y H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy **22**:417-419.
14. Tsuji, K. y S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. **36**:710-714.
15. Sweet, B. H. y J. F. Huxsoll. Depyrogenation by Dry Heat, ch. 12, p.101-108. En: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
16. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, capítulo <161>, USP, revisión actual, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Nuestro personal experto comentará gustosamente con usted los aspectos prácticos y teóricos de la prueba del LAL. No dude en llamar si desea hacer alguna pregunta sobre el uso del Pyrochrome. Sustituiremos cualquiera de nuestros productos que no cumpla las especificaciones del producto; póngase en contacto con el Servicio de Atención al Cliente antes de devolver un producto.

Limulus Amebocyte Lysate

Lysat d'Amoebocytes de Limule
Limulus Amöbocyten-Lysat
Lisato degli amebociti del *Limulus*
Lisado de amebocitos de *Limulus*

PYROCHROME®

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

Manufactured by:
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536
U.S. License #700
PN000856 Rev005
June 2007