

Lysat d'amébocyte de *Limule*

PYROTELL®-T

Fabriqué par :



124 Bernard E. Sant Joan Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Téléphone : (508) 540-3444
Appel gratuit : (888) 395-2221
Télécopie : (508) 540-8680
Assistance technique : (800) 848-3248
Service client : (800) 525-8378

PN000845-fr rév. 6 Avril 2017

Pour la détection et la quantification des endotoxines des bactéries gram négatives (Lipopolysaccharides)

Le réactif Pyrotell®-T du lysat d'amébocyte de *Limule* (LAL) est destiné pour la détection et la quantification *in vitro* d'endotoxines dans le contrôle des produits finis des médicaments injectables humains (y compris les produits biologiques), des médicaments injectables vétérinaires et des dispositifs médicaux. Il peut également être utilisé pour tester des matières premières (y compris l'eau) et les composants utilisés dans la production, ainsi que pour le contrôle au cours du processus des niveaux d'endotoxines. Le test d'endotoxines bactériennes USP (1) est le test officiel référencé dans les monographies USP spécifiques. Utiliser Pyrotell®-T uniquement aux fins de diagnostic *in vitro*. Pyrotell®-T n'est pas destiné à être utilisé pour la détection des endotoxines dans des échantillons cliniques ou pour le diagnostic des maladies chez l'homme ou l'animal.

Résumé du test

Le lysat d'amébocyte de *Limule* (LAL) est un extrait aqueux des cellules sanguines (amébocytes) de la *Limule*, *Limulus polyphemus*. En présence d'endotoxines, le LAL devient trouble et, dans des conditions appropriées, forme un caillot de gel solide. Le test LAL turbidimétrique est effectué par l'ajout d'un volume donné de Pyrotell®-T à un volume donné d'un échantillon, et l'incubation du mélange de la réaction à 37 °C. Plus la concentration des endotoxines dans l'échantillon est élevée, plus l'apparition de la turbidité est rapide. La turbidité peut être utilisée pour quantifier la concentration des endotoxines de deux façons.

Dans la méthode turbidimétrique cinétique LAL, on détermine soit le taux d'augmentation de la turbidité, soit le temps mis pour atteindre un niveau particulier de turbidité (le délai de réaction). Des concentrations d'endotoxines plus élevées donnent des délais de réaction plus courts. Le test nécessite une instrumentation spécialisée pour incuber plusieurs échantillons à une température contrôlée (généralement 37 °C) et relever les lectures de densité optique à des intervalles réguliers. Les courbes standard peuvent être construites en traçant le log du délai de réaction en fonction du log de la concentration de l'endotoxine standard, et sont utilisées pour calculer les concentrations des endotoxines dans les échantillons.

La méthode turbidimétrique LAL est rapide, spécifique, facile à exécuter et hautement sensible. La limite de détection dépend de la méthode et des instruments utilisés, et peut aller jusqu'à 0,001 unités d'endotoxine (UE) par ml.

Historique et principe biologique

Howell a décrit la coagulation du sang de *Limule* en 1885 (2). Dans les années 1950, Bang au Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, a découvert que des bactéries gram négatives provoquent la coagulation du sang de *Limule* (3). Levin et Bang avaient déterminé plus tard que la réaction est enzymatique et que les enzymes se trouvent dans les granules des amébocytes (4). Ils ont montré que la coagulation est déclenchée par un composant structurel unique de la paroi cellulaire bactérienne, appelé endotoxine ou lipopolysaccharide (5). On pense actuellement savoir que la réaction se compose de plusieurs étapes d'activation enzymatique enchaînées en cascade. Alors qu'on ne comprend pas encore la totalité de la réaction, la dernière étape est bien décrite. La protéine de coagulation (coagulogène) est clivée par l'enzyme de coagulation activée ; les produits du clivage insolubles coalescent par interaction ionique et la turbidité du mélange de la réaction augmente. Plus la quantité d'endotoxine présente est importante, plus l'apparition de la turbidité est rapide. Plus d'informations sur la réaction LAL et ses applications sont disponibles dans la littérature (6, 7).

Réactif

Pyrotell®-T est emballé sous forme lyophilisée. Pyrotell®-T contient un extrait aqueux d'amébocytes de *L. polyphemus*, de l'albumine sérique humaine (stabilisateur), du NaCl et d'autres ions appropriés. Aucun conservatif ou tampon n'est ajouté.

Pyrotell®-T n'est pas étiqueté avec une sensibilité spécifique. La sensibilité dans un test donné (désigné λ) est la plus faible concentration d'endotoxine utilisée pour construire la courbe standard. Dans le Pyros Kinetix Flex® (Associates of Cape Cod, Inc.), la limite de détection, et par conséquent, la plus petite valeur possible de λ , est de 0,001 UE/ml.

La toxicité de ce réactif n'a pas été déterminée ; par conséquent, une attention particulière doit être exercée lors de la manipulation de Pyrotell®-T.

Reconstituer Pyrotell®-T comme suit :

1. Taper doucement sur le flacon de Pyrotell®-T pour faire descendre le LAL libre en bas. Rompre le vide en soulevant le bouchon gris. Ne pas contaminer l'ouverture du flacon. Enlever et jeter le bouchon ; ne pas injecter à travers ni réutiliser le bouchon. La présence d'une petite quantité de LAL sur le bouchon n'affecte pas le test.
2. Reconstituer Pyrotell®-T avec de l'eau de réactif LAL (LRW, voir ci-dessous) ou un tampon compatible (disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.). Ajouter 5 ml comme indiqué sur l'étiquette du flacon. Une fois le réactif dissout, renverser doucement le flacon pour assurer l'homogénéité. Un mélange trop vigoureux peut causer un moussage excessif qui peut entraîner une perte de sensibilité. Recouvrir le flacon avec un film Parafilm M® (Bemis Company Inc.™) lorsqu'il n'est pas utilisé.

Conditions de stockage

Le test lyophilisé Pyrotell®-T est relativement stable pour la chaleur et s'il est maintenu réfrigéré, il conserve sa pleine activité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Stocker le produit entre -20 et +8 °C. Des températures en dessous de -20 °C peuvent causer le rétrécissement du bouchon, entraînant une perte de vide et une contamination éventuelles du Pyrotell®-T. Des températures dépassant 37 °C peuvent causer une détérioration rapide du test lyophilisé Pyrotell®-T, qui se traduit par une perte de sensibilité et un jaunissement distinct du produit. Pyrotell®-T est expédié avec des sachets froids dans des contenants isolés pour le protéger des températures élevées.

Le réactif reconstitué Pyrotell®-T est généralement transparent et légèrement opalescent. Un lot occasionnel présentera une légère turbidité uniforme. La présence de petites fibres ou de filaments n'indique pas une contamination ni n'affecte l'activité ; cependant, une précipitation de flocculant ou une couleur jaune distincte indiquent la détérioration.

Le réactif Pyrotell®-T reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé ; les flacons peuvent être maintenus pendant jusqu'à 24 heures entre 2 et 8 °C. Le réactif Pyrotell®-T reconstitué peut être congelé une seule fois. Il conservera son activité pendant trois mois s'il est congelé immédiatement après la reconstitution et maintenu à une température inférieure ou égale à -20 °C. Après décongélation, le même critère de qualité visuel s'applique que pour la reconstitution initiale.

Collecte et préparation de l'échantillon

Les échantillons doivent être collectés de façon aseptique dans des contenants non pyrogènes. L'utilisation d'une verrerie réutilisée dépyrogénée ou de plastique de polystyrène stérile jetable est recommandée pour minimiser l'adsorption de l'endotoxine sur les surfaces du contenant. Tous les contenants en plastiques ne sont pas exempts d'endotoxines détectables et une substance qu'il est possible d'extraire de certains types peut interférer avec le test LAL. L'utilisation du tampon Pyrosol® permet souvent de neutraliser les variations dues à une interférence causée par les consommables. L'acceptabilité des ustensiles de laboratoire peut être testée par une sélection aléatoire des contenants à partir d'un lot, le rinçage des contenants avec un petit volume de LRW à température ambiante pendant une heure, et le test de la solution de rinçage comme un échantillon. La solution de rinçage doit contenir sensiblement moins d'endotoxine que la plus basse concentration standard à utiliser. En outre, la solution de rinçage ne doit pas inhiber ni améliorer le test tel qu'il est déterminé par la récupération d'une quantité connue d'endotoxine ajoutée.

Le pH du mélange de réaction doit être compris entre 6 et 8. Ajuster le pH de l'échantillon en ajoutant du HCl, NaOH, ou tampon (exempt d'endotoxine détectable). Diluer la solution concentrée de HCl ou de NaOH avec du LRW et utiliser des quantités normales qui n'entraîneront pas une dilution significative de l'échantillon de test. Si un précipité se forme dans l'échantillon après ajustement du pH, diluer l'échantillon (sans dépasser la dilution maximale acceptable – consulter la section « Limitations de la procédure ») avant d'ajuster le pH. Alternativement, reconstituer le réactif Pyrotell®-T avec un tampon compatible (disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.) et vérifier le pH du mélange de réaction. Ne pas ajuster le pH d'une solution saline ou de l'eau non tamponnées. Noter que la dilution peut à elle seule résoudre les problèmes de pH.

Les substances qui dénaturent les protéines, les chélates, les endotoxines liées, ou altèrent l'état hydrophobe des endotoxines peuvent interférer avec le test. Une interférence peut être détectée comme la récupération d'une quantité d'endotoxine sensiblement supérieure ou inférieure à celle prévue lorsqu'une quantité connue de l'endotoxine standard est ajoutée à l'échantillon (voir « Limitations de la procédure »). Dans la plupart des cas, la dilution de l'échantillon réduit la concentration et l'activité des substances interférentes tout en donnant des résultats de test valides. Les contrôles et schémas de dilution appropriés sont discutés sous « Procédure de test. »

Les échantillons doivent être testés dès que possible après la collecte. Il est préférable de congeler les échantillons non stériles qui seront stockés ou expédiés avant le test. Les échantillons pour lesquels il est attendu d'obtenir de faibles concentrations d'endotoxine (moins de 1 UE/ml) doivent être testés pour la perte d'endotoxine pendant le stockage.

Procédure de test

Réactifs de test

1. Pyrotell®-T (voir la description et la méthode de reconstitution ci-dessus).
2. Eau du réactif LAL (LRW), non fournie avec Pyrotell®-T ; commander séparément. Le test Pyrotell®-T lyophilisé doit être reconstitué avec de l'eau (ou un tampon compatible disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc., voir l'élément 3 ci-dessous) qui ne présente pas un niveau d'endotoxine détectable dans le test LAL. Les sources d'eau recommandées incluent l'eau stérile Associates of Cape Cod, Inc. ou toute autre eau stérile USP pour injection (EPI stérile) disponible dans le commerce sans bactériostat, ou de l'eau USP pour irrigation. N'importe laquelle de ces sources d'eau peut être utilisée, étant donné qu'elles se sont avérées acceptables pour une utilisation comme LRW. La limite d'endotoxine pour l'EPI USP stérile est de seulement 0,25 UE/ml ; par conséquent, l'EPI stérile peut contenir une endotoxine détectable et ne pas être appropriée pour l'utilisation.

Pour certifier que l'eau est acceptable comme LRW, la tester comme un échantillon avec un contrôle de produit positif (voir l'élément 1.c. dans la section « Contrôle »). Utiliser une LRW certifiée pour reconstituer Pyrotell®-T, préparer des dilutions des standards, et préparer des contrôles positifs (voir les éléments 1.a. et 1.b. sous « Contrôles »). Construire une courbe standard à partir des délais de réaction des standards. Le coefficient de corrélation doit être d'au moins 0,980 (valeur absolue). La concentration d'endotoxines de l'eau testée peut être estimée par l'extrapolation de la courbe standard en dessous de la plus faible concentration d'endotoxines et doit être inférieure à celle du standard le plus bas. En outre, la concentration d'endotoxine du contrôle de produit positif doit se situer entre 50 % et 200 % de la concentration nominale du « pic » d'endotoxine ajoutée.

3. Tampon, non fourni avec Pyrotell®-T ; commander séparément si nécessaire. Le tampon Pyrosol (réf. catalogue BC051 ou BC554) ou le tampon Glucashield™ (réf. catalogue GB051) peuvent être utilisés à la place de LRW pour reconstituer Pyrotell®-T afin d'aider à résoudre le problème de pH de l'échantillon, l'interférence des consommables ou l'interférence des glucanes.
4. Endotoxine standard, non fournie avec Pyrotell®-T ; commander séparément. L'endotoxine standard de contrôle (ESC), obtenue auprès d'Associates of Cape Cod, Inc., est utilisée pour construire des courbes standards, valider le produit et préparer les contrôles d'inhibition. Chaque flacon contient un poids mesuré d'endotoxine. Le standard de référence d'endotoxine USP peut être obtenu auprès de l'U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Suivre les indications du fabricant pour la reconstitution et le stockage des endotoxines standards. Les lots d'ESC peuvent présenter différentes puissances (UE/ng) lorsqu'ils sont testés avec des lots différents de Pyrotell®-T. Si vous utilisez une ESC, les concentrations d'endotoxine peuvent être exprimées en UE/ml si la puissance d'un lot donné d'ESC a été déterminée avec le lot Pyrotell®-T en question (1, 2).

Matières et équipements (non fournis)

1. Cuves de réaction. Le choix du type dépend des instruments utilisés pour mesurer la turbidité. Les tubes de réaction pour le système Pyros Kinetix Flex sont des tubes en verre borosilicate dépyrogénés de 8 x 75 mm (TK100).
2. Lecteur optique. Pour la méthode turbidimétrique cinétique, l'utilisation d'un lecteur d'incubation optique tel que le Pyros Kinetix Flex ou le BioTek ELx 808 IU disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc. est recommandée.

3. *Racks à tubes de test* pour maintenir et/ou incuber les tubes de réaction.
4. *Pipettes*, dispositifs de pipetage automatique avec pointes de pipettes, ou dispositifs de pipetage répété avec cylindres de seringue en plastique. Des pipettes jetables et des pointes exemptes d'endotoxines et de glucanes interférents sont recommandées. Associates of Cape Cod, Inc. offre la gamme Pyroclear®, qui est livrée avec un certificat de conformité certifiant que les produits sont exempts d'endotoxines et de glucanes interférents.
5. *Mélangeur Vortex*.
6. *Parafilm M®*. Le côté en contact avec le support en papier est normalement non pyrogène.
7. *Tubes de test non pyrogènes* avec une capacité adéquate pour préparer des dilutions de standards d'endotoxines ou d'échantillons de test. Voir « Collecte et préparation de l'échantillon » pour d'autres contenants convenables pour les dilutions.
8. *Four à air chaud* avec une capacité de 250 °C pour la dépyrogénéation de la verrerie. Les réglages de temps et de température minimum les plus courants sont 30 minutes à 250 °C (1,8,9).

Contrôles

Les contrôles sont nécessaires pour assurer un test valide. Les procédures recommandées sont détaillées USP (1).

1. Contrôles d'endotoxine

- a. **Série standard d'endotoxine.** Préparer un nouvel ensemble de dilutions à partir de la solution d'endotoxine mère pour chaque test. Ne pas utiliser de dilutions préalablement préparées, sauf si la stabilité de cette gamme de concentrations a été démontrée. Faire des dilutions dans une série géométrique (par exemple des dilutions doubles, quadruples ou décuplées) pour obtenir la gamme de concentrations d'endotoxines requises. Des concentrations de 1,0, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 et de 0,03125 UE/ml sont recommandées pour vérifier les performances du test Pyrotell®-T. La concentration d'endotoxine la plus faible de toute série standard est la limite de détection de ce test particulier et est désignée par λ . Pour obtenir la gamme de standards requise, utiliser aussi peu de dilutions que possible avec des volumes de pipette appropriés pour maximiser la précision.
- b. Un **contrôle positif** (une concentration d'endotoxine standard unique) doit être inclus si la série standard (voir a. ci-dessus) n'est pas préparée de la même manière que les contrôles de produit positifs (voir c.). Une concentration de 4λ est appropriée pour des courbes standard construites à partir de 4, 5 ou 6 dilutions doubles de l'endotoxine standard (p. ex. $4\lambda = 0,125$ UE/ml dans la série standard donnée dans la section a. ci-dessus). Dans les situations où l'incrément de dilution est plus que double, la concentration du contrôle positif devrait être égale à celle d'un standard à partir du milieu de la courbe standard. Par exemple, une valeur de 0,1 UE/ml serait appropriée pour les contrôles positifs inclus dans une série standard comprenant des concentrations de 0,001, 0,01, 0,1 et 1,0 UE/ml. Si une série standard n'est pas incluse dans un test, un contrôle positif doit être inclus pour vérifier qu'il est approprié d'utiliser les paramètres d'une courbe standard précédente pour calculer les concentrations d'endotoxines. Se reporter à la directive de la FDA (1) et aux Directives provisoires (2) sous Tests de routine des médicaments (ou dispositifs) par le test LAL pour les détails.

- c. **Contrôle du produit positifs** sont les contrôles d'inhibition/ d'amélioration et se composent de l'échantillon ou de la dilution de l'échantillon auquel l'endotoxine standard est ajoutée. La concentration d'endotoxine ajoutée dans l'échantillon de test doit être la même que celle du contrôle positif. Voir la section b. ci-dessus pour la sélection de la concentration d'endotoxine appropriée pour le contrôle du produit positif. L'endotoxine ajoutée est souvent appelée « pic ».

2. Contrôles négatifs

Les contrôles négatifs de LRW doivent être inclus dans chaque test.

Préparation de l'échantillon - Détermination de la dilution de test

Si un protocole de test a déjà été développé pour le type d'échantillon testé, effectuer la dilution nécessaire pour le test et procéder comme indiqué dans la section « Réalisation du test » ci-dessous. Si aucun protocole n'a été développé pour le type d'échantillon, faire une série de dilutions de dix fois de l'échantillon. Ne pas dépasser la dilution maximale acceptable (MVD) du produit par un facteur supérieur à 10. [Se reporter à « Limitations de la procédure » ci-dessous ou USP (1) pour une explication et le calcul de la MVD].

Préparer des dilutions appropriées de tous les échantillons avec un contrôle de produit positif pour chaque échantillon.

Réalisation du test

Une **technique cohérente** est nécessaire pour obtenir des résultats satisfaisants. Tous les contrôles et échantillons doivent être testés (au moins) en double.

1. Préparer l'instrumentation de test selon le besoin. Dans un système automatisé, cela implique généralement de saisir des descripteurs d'échantillons et de définir les paramètres de test des échantillons.
2. Ajouter le volume approprié de l'échantillon (contrôle négatif, standard d'endotoxine, échantillon, contrôle positif ou contrôle de produit positif) au tube de réaction ou à la microplaque. Pour un rapport de 1:1 dans le Pyros Kinetix Flex, utiliser 0,1 ml ; pour un ratio de 1:4 dans le Pyros Kinetix Flex, utiliser un volume de 0,2 ml ou de 0,4 ml.
3. Ajouter Pyrotell®-T selon les besoins de la procédure. Pour les méthodes utilisant des tubes de réaction individuels, la temporisation de la réaction dans chaque tube est critique. Ajouter Pyrotell®-T au tubes de réaction un à un, mélanger pendant environ 2 secondes et placer le tube dans le lecteur optique d'incubation. Le volume de Pyrotell®-T ajouté est 0,1 ml pour la méthode de ratio 1:1 du Pyros Kinetix Flex, et la plupart des autres méthodes. Pour le ratio 1:4 du Pyros Kinetix Flex, si le volume de l'échantillon est de 0,4 ml, ajouter 0,1 ml de LAL. Si vous utilisez un volume d'échantillon de 0,2 ml, un volume de 0,05 ml de LAL est approprié. Le fait de ne pas bien mélanger est une cause fréquente de tests insatisfaisants. Pyrotell®-T peut être ajouté le plus facilement à l'aide d'un dispositif de pipetage répété. Il est recommandé d'utiliser une pipette ou une pointe de pipette neuve pour chaque entrée dans le flacon de Pyrotell®-T. Différents volumes de Pyrotell®-T peuvent convenir à d'autres protocoles de test.
4. Une fois l'incubation démarrée, ne pas perturber le(s) tube(s) de réaction. Le banc de laboratoire supportant l'incubateur/lecteur optique ne doit pas présenter de vibrations excessives.

5. Lire le test. Laisser le test s'exécuter jusqu'à ce que tous les échantillons aient été incubés pendant plus longtemps que le temps requis pour que la concentration d'endotoxine standard la plus basse atteigne la densité optique de déclenchement. Les systèmes de test automatisés terminent généralement le test après une période prédéfinie.

Résultats

1. **Calculs préliminaires.** Déterminer le temps mis par les échantillons pour atteindre un seuil de densité optique particulier (habituellement 0,02 unités de DO dans un lecteur de tube) après que toutes les corrections de données ont été faites. Les lectures de densité optique doivent être relatives à une lecture initiale prise qui doit être de 0 unités de DO. Le logiciel du système le fera. Le temps mis pour atteindre la valeur de DO est appelé **décali de réaction**.

2. Construire une courbe standard.

Construire une courbe standard par régression linéaire du log du décali de réaction sur le log de la concentration d'endotoxine pour les standards. L'équation de la ligne de régression décrit la courbe standard (à moins que l'option d'utiliser la régression polynomiale soit choisie comme décrit dans le paragraphe suivant).

État donné que la valeur absolue du coefficient de corrélation pour la courbe standard est d'au moins 0,980 (voir le point 2 de l'interprétation ci-dessous), une équation de ligne de régression polynomiale (c'est-à-dire quadratique) peut être utilisée pour calculer les concentrations d'endotoxines.

3. **Calculer les concentrations d'endotoxines.** Calculer les concentrations d'endotoxines de tous les échantillons (y compris les standards et les contrôles) en utilisant l'équation linéaire pour une ligne droite :

$$Y = aX + b$$

où :

Y = log du décali de réaction

X = log de la concentration d'endotoxine

a = pente de la ligne

b = l'intersection des Y.

Pour le modèle quadratique, l'équation est :

$$Y = a_1X + a_2X^2 + b$$

Où a_1 et a_2 sont les pentes de X et de X^2

Ces calculs sont couramment effectués par le logiciel du système de test d'endotoxines.

Interprétation

1. Pour qu'un test soit valide, la concentration d'endotoxines des contrôles négatifs (estimée par extrapolation de la courbe standard) doit être inférieure à celle de la concentration standard la plus basse.
2. Lorsqu'une courbe standard est incluse dans le test, la valeur absolue du coefficient de corrélation pour la courbe standard doit être supérieure ou égale à 0,980.
3. La concentration moyenne d'endotoxines mesurée des contrôles positifs doit se situer à 25 % de la concentration nominale. Ainsi, si le contrôle positif est de 0,125 UE/ml, la concentration mesurée doit être comprise entre 0,093(75) et 0,156(25) UE/ml.

4. Déterminer la plage moyenne des délais de réaction de la courbe standard. Par exemple, si les délais de réaction de deux réplicats de la concentration d'endotoxine standard la plus élevée sont 1079 et 1087 secondes et ceux de la concentration la plus faible sont 1954 et 1968, la plage moyenne des délais de réaction est de 1083 à 1961. Des concentrations d'endotoxines valides ne peuvent être calculées que pour des échantillons ayant un décali de réaction moyen compris dans la plage moyenne des délais de réaction de la courbe standard.

Par exemple, un résultat valide peut être obtenu pour un échantillon inconnu qui donne des délais de réaction de 1949 et 1965 (moyenne = 1957), même si l'un des réplicats se trouve en dehors de la plage standard.

5. Afin de démontrer que l'échantillon n'interfère pas de manière significative avec la réaction LAL/endotoxine, la concentration d'endotoxine mesurée du contrôle de produit positif doit se situer entre 50 et 200 % de la concentration nominale du « pic » d'endotoxine ajoutée. Avant de déterminer si le pic est récupéré dans ces limites, soustraire la concentration d'endotoxine mesurée dans l'échantillon (non dopé). Par exemple, pour être considérée comme exempte d'interférence significative, la concentration d'endotoxine mesurée dans un contrôle de produit positif de 0,125 UE/ml (après soustraction de toute endotoxine dans l'échantillon non dopé) doit être comprise entre 0,0625 et 0,25 UE/ml (50 à 200 % de 0,125 UL/ml). Si la concentration d'endotoxine mesurée dans l'échantillon non dopé est de 0,028 UE/ml et celle dans le contrôle de produit positif est de 0,163 UE/ml, l'endotoxine attribuable au pic est de 0,163 - 0,028 = 0,135 UE/ml. Cette valeur est dans la plage, et sous réserve que d'autres conditions soient remplies, le test de l'échantillon est valide.

Limitations de la procédure

La procédure est limitée par l'étendue de la capacité d'inhibition ou d'amélioration de l'échantillon testé. Si la procédure ne peut pas être validée (1) à une concentration d'échantillon supérieure à la concentration minimale acceptable (MVC), le test LAL ne peut pas remplacer le test pyrogène USP. La MVC est calculée comme suit :

$$MVC = \frac{(\lambda) (\text{dose d'échantillon})}{(\text{limite de tolérance aux endotoxines})}$$

où λ est exprimée en UE/ml, la dose d'échantillon est exprimée en unités par kg du poids du corps, et la limite de tolérance aux endotoxines est exprimée en UE/kg.

La dilution maximale acceptable (MVD) est la dilution de l'échantillon contenant la MVC (1). C'est la concentration initiale de l'échantillon divisée par la MVC.

La limite de tolérance aux endotoxines pour les médicaments parentéraux est spécifiée dans les monographies individuelles(1). La limite pour les dispositifs médicaux est exprimée par ml d'un volume d'extraction ou de rinçage obtenu comme décrit dans l'USP (10) sur la base des limites pour les dispositifs. Pour les dispositifs n'entrant pas en contact avec le liquide céphalo-rachidien, la limite est de 20 UE/dispositif ; pour ceux qui le font, c'est 2,15 UE/dispositif. La limite pour les dispositifs liquides est la même que pour les médicaments.

La trypsine provoquera un faux résultat positif à moins d'être dénaturée par un traitement thermique avant le test. Des matières tels que le sang, le sérum, l'albumine et le plasma peuvent interférer avec les tests turbidimétriques.

Valeurs attendues

Les concentrations d'endotoxines dans les échantillons peuvent être quantifiées dans une plage de concentrations d'endotoxine standard utilisée pour construire la courbe standard. S'il est nécessaire de diluer l'échantillon pour remédier à toute inhibition ou amélioration, la plus petite quantité d'endotoxine détectable sera augmentée en conséquence. Les matériaux dérivés de sources biologiques, même après purification biochimique, peuvent encore contenir des niveaux mesurables d'endotoxine. L'eau obtenue par distillation, osmose inverse ou ultrafiltration peut contenir moins d'endotoxines que détectable tant que le processus de purification fonctionne correctement et que l'eau n'est pas contaminée après la production.

Bibliographie

1. Bacterial Endotoxin Test, chapter <85> United States Pharmacopeia (current version), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
2. 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.
3. 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.
4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
6. 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.
7. Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
8. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:710-714.
9. Sweet, B. H. and J. F. Huxsoll. Depyrogenation by dry heat, ch. 12, p. 101-108. In: Depyrogenation, Technical Report No. 7, 1985. Parenteral Drug Association, Inc., Philadelphia, PA.
10. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Notre personnel expérimenté discutera volontiers avec vous des aspects pratiques et théoriques du test LAL. Veuillez appeler si vous avez des problèmes à utiliser Pyrotell®-T.

Pour télécharger le mode d'emploi PDF de Pyrotell®-T dans plusieurs langues, veuillez consulter www.acciusa.com