Limulus Amebocyte Lysate

PYROCHROME®

Manufactured by:
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Telephone: (508) 540-3444
Facsimile: (508) 540-8680
Technical Assistance: (800) 848-3248
Customer Service: (800) 525-8378

PN000856-en Rev3 U.S. License #700 January, 2011

PYROCHROME®

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

The *Limulus* amebocyte lysate (LAL) test, when used according to U.S. Food and Drug Administration (FDA) guidelines (1), may be substituted for the U.S. Pharmacopeia (USP) Pyrogen Test (rabbit fever test) for the end-product testing of "human injectable drugs (including biological products), animal injectable drugs, and medical devices." The LAL test is recommended for the quantitation of endotoxin in raw materials used in production, including water, and for in-process monitoring of endotoxin levels. The USP Bacterial Endotoxins Test (2) is the official LAL test referenced in specific USP monographs and is harmonized with equivalent chapters in European Pharmacopoeia (EP) (3) and the Japanese Pharmacopoeia (JP) (4).

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 colorless artificial peptide substrate present in Pyrochrome® LAL. Proteolytic cleavage of the substrate liberates para-nitroaniline (*p*NA), 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 *p*NA will be produced. Pyrochrome® can be used to quantify endotoxin concentration in two ways (5). 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 log onset time against the log concentration of standard endotoxin and are used to calculate endotoxin concentrations in specimens. Alternatively, in the endpoint chromogenic method, the amount of *p*NA released can be measured following a fixed incubation period. A standard curve, consisting of 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, *p*NA (formed during the endpoint chromogenic method) is reacted with nitrite in HCl and then with N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine (NEDA) to form a diazotized magenta derivative that absorbs at a range between 540-550 nm.

Pyrochrome® test methods are rapid, specific, easy to perform, and highly sensitive. The detection limit depends on the method and instrumentation used and may be as sensitive as 0.001 Endotoxin Units (EU) per mL.

History and Biologic Principle

Howell described the clotting of *Limulus* blood in 1885 (6). In the 1950's, at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, Bang discovered that gram negative bacteria cause *Limulus* blood to clot (7). Levin and Bang later determined that the reaction is enzymatic and that the enzymes are located in granules in the amebocytes (8, 9). They showed that clotting is initiated by a unique structural component of the bacterial cell wall called endotoxin or lipopolysaccharide (10). Current understanding is that the reaction consists of a cascade of enzyme activation steps terminating in the cleavage of the protein, coagulogen. The insoluble cleavage product of coagulogen (coagulin) coalesces by ionic interaction. If sufficient coagulin forms, turbidity appears followed by the formation of a gel-clot. This interaction forms the basis of an assay for endotoxin termed the *Limulus* amebocyte lysate (LAL) test. In 1977, Japanese investigators discovered that endotoxin-activated LAL would also cleave small chromogenic peptides which contained an amino acid cleavage site similar to coagulogen and the chromophore, paranitroanilide (11). Cleavage results in the release of *p*NA, 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 chromogenic LAL reagent, a color is 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 endpoint (gel-clot, turbidity, or color) develops. More information about the LAL assay types, reaction, and applications is available in the literature (12, 13, 14).

Reagent

Pyrochrome® is packaged at 3.2 mL/vial in lyophilized form. It contains an aqueous extract of amebocytes of *Limulus polyphemus*, stabilizer, salts, buffer and chromogenic substrate.

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 0.001 EU/mL in a kinetic assay and 0.005 EU/mL in an endpoint assay. 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 has resulted in a Type I allergic reaction in some individuals (15). Thus, caution should be exercised when handling Pyrochrome®.

Reconstitution Procedure:

1. Gently tap the vial of Pyrochrome® to cause loose material to fall to the bottom. Break the vacuum by lifting the gray stopper. Do not contaminate the mouth of the vial. Remove and discard the stopper; do not inject through or reuse the stopper. A small amount of LAL powder remaining on the stopper will not affect the test.
2. Reconstitute Pyrochrome® with 3.2 mL Pyrochrome® Buffer or Glucashield® buffer (available separately from Associates of Cape Cod, Inc.). To obtain a sensitivity of 0.001 EU/mL in a microplate reader, it is necessary to reconstitute Pyrochrome® with Glucashield®. This sensitivity can be attained with either Pyrochrome® reconstitution buffer or Glucashield® buffer in a tube reader. The pellet will take a few minutes to go into solution, therefore, rehydrate at least 5 minutes prior to use. Swirl vial to insure homogeneity but 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) 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 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. The presence of small fibers or strands does not indicate contamination nor affect activity; however, flocculent precipitation or a distinct yellow color indicates deterioration and the reagent should not be used. Reconstituted Pyrochrome® is less stable than the lyophilized product; vials may be held for up to 8 hours at 2-8°C. Note that it may be necessary to use freshly reconstituted reagent to obtain maximum sensitivity. 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 polyethylene 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 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. Also, the rinse should neither inhibit nor enhance the test as determined by recovery of a known amount of added endotoxin. The pH of the reaction mixture (a volume of specimen or specimen dilution mixed with an equal volume of Pyrochrome®) should be 6 to 8. Adjust the pH of the specimen with HCl, NaOH, or buffer (free of detectable endotoxin). Dilute concentrated HCl or NaOH with LRW to an appropriate concentration and use a volume that will not lead to significant dilution of the test specimen. If a precipitate forms in the sample upon pH adjustment, dilute the sample (not to exceed the MVD – see "Limitations of Procedure") before adjusting the pH. Do not adjust the pH of unbuffered saline or water. Note that dilution alone may overcome pH problems.

Substances that denature proteins, chelate ions, bind endotoxin or alter endotoxin's hydrophobic state may interfere with the test. Interference may be detected as recovery of significantly more or less endotoxin than expected when a known amount of standard endotoxin is added to the specimen (see "Limitations of Procedure"). In most cases, dilution of the specimen will reduce the concentration and activity of interfering substances and still yield valid test results. Appropriate controls and dilution schemes are discussed under "Test Procedure." Specimens should be tested as soon as possible after collection. It may be advisable to freeze 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 description under Reagent and Reconstitution Procedure above).
2. *Pyrochrome® Reconstitution Buffer* (catalog number C1500 only). Use the buffer to reconstitute Pyrochrome® as described above.
3. *Glucashield® Reconstitution Buffer* (catalog number CG1500 only). Use the buffer to reconstitute Pyrochrome® as described above.
4. *Control Standard Endotoxin* (CSE) - Diazo kit (CD060) only: Each vial of CSE contains 10 ng. Reconstitute 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 go into 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. Vortex between dilutions. 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. USP Endotoxin Reference Standard (identical to 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® or with Pyrotell or Pyrotell-T. 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.**

   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 10 ng/vial CSE as a depyrogenation control.
5. *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). Reconstitute 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. 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 (identical to 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®, Pyrotell, or other brands of LAL reagent (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.**

   Use CSE to prepare dilutions of standard endotoxin from which to construct standard curves, for positive controls and for positive product (interference) controls.
2. *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.

   To certify that water is acceptable 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 correlation coefficient should be at least 0.980 (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. *Glucashield® 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)-β-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 and should not cause inhibition or enhancement. Check microplates before use and discard if scratches or other optical interference is observed on or in the bottoms of the wells.
2. *Reaction tubes*. Kinetic assays can be run in an incubating tube reader such as the Pyros Kinetix® Flex using 8 x 75 mm, depyrogenated, borosilicate glass culture tubes (Associates of Cape Cod, Inc. catalog number TK100). The end-point assays can also be run in 8 x 75 mm or 10 x 75 mm, depyrogenated, borosilicate glass culture tubes (Associates of Cape Cod, Inc. catalog numbers TK100 and TB050 respectively).
3. *Optical reader* capable of reading at 405 nm, or at 540-550 nm for the diazo method. For the kinetic method, use an incubating microplate reader, such as the BioTek® ELx808™ or the Molecular Devices VersaMax™, or a tube reader such as the Pyros Kinetix® Flex tube reader (Associates of Cape Cod, Inc. catalog numbers PKF32, PKF64 and PKF96).

   For the endpoint method, use a microplate reader to read microplates or, if running the test in tubes, a spectrophotometer with appropriate cuvettes.
4. *Incubator* capable of maintaining 37±1°C (required for the 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 uniform heat distribution.
5. *Test tube racks* to hold and/or incubate dilution and reaction tubes.
6. *Pipets*, micropipets with pipet tips (multichannel pipettors are useful when using microplates), or repeating pipettors with plastic syringe barrels. Disposable pipets and tips free of interfering endotoxins and glucans are recommended. Associates of Cape Cod, Inc., offers the Pyroclear® line of products, which are certified to be free of interfering endotoxins and glucans.
7. *Vortex-type mixer.*
8. *Parafilm M®* (American National Can™). The side in contact with the paper backing is typically free of detectable endotoxin.
9. *Test tubes* that are free of interfering endotoxin with adequate capacity for making dilutions of endotoxin standard or test specimen. 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 cycles assure that all articles in the oven are exposed to minimum time and temperature of 30 minutes and 250°C (2, 16, 17).

Controls

Controls are necessary to insure a valid test. Recommended procedures are detailed by the FDA (1) and USP (2), EP (3) and JP (4).

1. Endotoxin controls.

a. **Endotoxin standard series.** Prepare a fresh set of dilutions from the stock endotoxin solution for each test. Do not use previously prepared and stored dilutions unless you have demonstrated the stability of that range of concentrations. Make dilutions in a geometric series to give the range of endotoxin concentrations required. Twofold 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:** detection limits of 0.005 and 0.001 EU/mL are possible with Pyrochrome® in endpoint and kinetic tests respectively). To get to the range of standards required, use as few dilutions as possible with appropriate pipet volumes to maximize accuracy. Dilutions can be made in glass or suitable plastic test tubes or directly in a microplate. Maximum concentrations detected with Pyrochrome® are method dependent. For guidance, see the recommended incubation times available for Pyrochrome®.

b. **Positive control** (a single standard endotoxin concentration) should be included if the standard series (see a. above) is not prepared in the same way as the positive product controls (see c. below). The endotoxin concentration of the positive control should equal that of a standard from the middle of the standard curve. A value of 0.5 EU/mL would be appropriate for positive controls included with a standard series consisting of 0.005, 0.05, 0.5, 5 and 50 EU/mL. If a standard series is not included in a test, a positive control must be included to verify that it is appropriate to use the parameters of a previous (archived) standard curve to calculate endotoxin concentrations. Refer to the FDA guideline (1) under Routine Testing of Drugs by the LAL Test for details. The positive control should be prepared in water in the same manner as the PPC in product.

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

2. Negative controls.

LRW negative controls should be included with each test.

Specimen Preparation - Determination of Test Dilution

If a test protocol has been developed previously for the type of specimen under test, make the necessary dilution for the assay and proceed as directed under "Performing the Test." 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 10. (Refer to "Limitations of Procedure" below or the FDA Guideline (1) for explanation 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. Care should be taken to avoid contamination when setting up the test. Equipment should be appropriately calibrated and qualified to assure uniform incubation temperatures.

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 positive product control) to give the appropriate ratio when Pyrochrome® is added (see 3. below).

   Tests run in a microplate reader: a 1:1 lysate to sample ratio is used. For optimal performance, use a volume of 0.05 mL of sample for any such method (kinetic, endpoint or diazo-coupling). Alternatively, 0.1 mL may be used for the kinetic and endpoint methods, though use of 0.05 mL is recommended to attain maximum sensitivity or for a wide range standard curve (greater than three log range).

   Tests run in the Pyros Kinetix® Flex tube reader: a lysate to sample ratio of either 1:1 or 1:4 may be used. A sample volume of 0.1 mL is required for tests run using a 1:1 ratio of Pyrochrome® LAL reagent to sample. For tests in the Pyros Kinetix® Flex tube reader in which a 1:4 ratio of Pyrochrome® LAL reagent to sample is used, the sample volume should be 0.2 mL.
3. Add Pyrochrome® as appropriate for the method and mix. Failure to mix adequately is a common cause of unsatisfactory tests. Most platereaders have a shake function.
   a. For a microplate, a 1:1 lysate to sample ratio is used and the volume of Pyrochrome® added is equal to the sample volume (see 2. above; typically 0.05 mL). Add Pyrochrome® as rapidly as possible to all samples and mix from 5 to 30 seconds. Either put the plate on an incubator block (for an endpoint test) or into an incubating microplate reader (for a kinetic test).
   b. For methods using individual reaction tubes or cuvettes, the volume of Pyrochrome® added can either be equal to the sample volume (0.1 mL in a Pyros Kinetix® Flex tube reader) or one quarter for the sample volume (0.05 mL in a Pyros Kinetix® Flex tube reader). Important: the reaction time should be the same for all tubes. In the case of the Pyros Kinetix® Flex tube reader, the instrument detects the reaction tube upon insertion and initiates timing. To each reaction vessel in turn, add Pyrochrome®, mix for approximately 2 seconds and place the vessel into the incubating device (for endpoint tests) or tube reader (for kinetic tests).

      Regardless of whether microplates or reaction tubes are used, a repeating pipettor is convenient for adding Pyrochrome®.

      Care should be taken to avoid contaminating the vial of Pyrochrome® when handling the reagent.
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 lowest standard endotoxin concentration to reach the onset OD405. Automated test systems will usually terminate the test after a preset period. Request recommended incubation times for guidance.
   b. For the endpoint method, time the incubation precisely, remove the plate or reaction tubes from the incubator, stop the reaction by adding 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 microplate 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 (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. 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 the reaction by adding 0.05 mL of solution 1 (sodium nitrite reconstituted with HCl). Agitate the plate to mix. Using a new pipette tip, add 0.05 mL of solution 2 (ammonium sulfamate) to each reaction well and mix. Finally, add 0.05 mL of solution 3 (NEDA) to each well with a new pipette tip and mix. 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.

For the kinetic method, determine the time taken for specimens to reach a particular optical density threshold (usually 0.03 OD units) after any data corrections have been made. Optical density readings must be relative to an initial reading taken to be zero OD units. Many microplate readers have software packages 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.

   Provided that the absolute value of the correlation coefficient for the standard curve is at least 0.980 (see point 2. under Interpretation below), a second degree/order polynomial (i.e. quadratic) regression line equation may be used to calculate endotoxin concentrations.

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 $Y = aX + b$ rearranged as $X = (Y – b) / a$

where:

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

X: Kinetic method: X = log endotoxin concentration (it is necessary to determine the antilog of X to obtain the endotoxin concentration)
Endpoint method: X = endotoxin concentration

a = slope of the line

b = the Y intercept

Multiply the endotoxin concentration calculated from the standard line by the dilution of the sample to express the concentration in terms of the original, undiluted sample.

These calculations are commonly performed by endotoxin testing software.

Interpretation

1. In order for a test to be valid, the endotoxin concentration of negative controls (estimated by extrapolation of the standard curve) should be significantly less than that of the lowest standard concentration.
2. The correlation coefficient for the standard curve included with the test should have an absolute value of at least 0.980.
3. The mean measured endotoxin concentration of positive controls (for verification of an archived curve) must be within 25% of the nominal concentration. Thus, if the positive control is 0.125 EU/mL, the measured concentration must be between 0.09375 and 0.15625 EU/mL.
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 of the added endotoxin 'spike.' Before determining whether the spike is recovered within these limits, subtract the endotoxin concentration measured in the (unspiked) specimen. For example, in order to be considered free of significant interference, the measured endotoxin concentration in a 0.125 EU/mL positive product control (after subtraction of any endotoxin in the unspiked specimen) must be within the range 0.0625–0.25 EU/mL (50 to 200% of 0.125 EU/mL). If the measured endotoxin concentration in the unspiked specimen is 0.028 EU/mL and that in the positive product control is 0.163 EU/mL, the endotoxin attributable to the spike is 0.163 – 0.028 = 0.135 EU/mL. This is within the range and subject to other requirements being met; the test of the sample is valid.

Limitations of Procedure

The procedure is limited by the extent of the inhibition or enhancement capacity of the specimen under test. If the procedure cannot be validated (1, 2) at a specimen concentration that is greater than the minimum valid concentration (MVC), then the bacterial endotoxins test using LAL reagent cannot be substituted for the USP Pyrogen Test. The MVC is calculated as follows:

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

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

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

The endotoxin tolerance limit is 0.2 EU/kg for drugs with an intrathecal route of administration and 5 EU/kg for all other parenterally administered products. The limit for medical devices is expressed per mL of an extraction or rinse volume obtained as described in the USP (18) 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 guideline (1).

Some serine proteases (e.g. trypsin, activated blood factors) will cause a false positive result unless denatured (for example, by heat treatment) before testing. Yellow-colored materials such as animal serum, albumin, and plasma may interfere with *p*NA based chromogenic assay. For these products, use the diazo-coupling assay (Associates of Cape Cod, Inc. catalog number CD060). Excess turbidity in a sample may also interfere with the test.

Expected Values

Endotoxin in specimens can be quantified between the range of standard endotoxin concentrations used to construct the standard curve. If it is necessary to dilute the specimen to overcome any inhibition or enhancement, the least amount of endotoxin that can be detected will be increased accordingly. Materials derived from biological sources, even after biochemical purification, may still contain measurable levels of endotoxin. Water obtained by distillation, reverse osmosis, or ultrafiltration may contain less endotoxin than detectable as long as the purification process is operating correctly and the water is not contaminated after production.

Bibliography

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, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
6. 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.
7. 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.
8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
13. 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.
14. 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.
15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
17. 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.
18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Our experienced staff will be pleased to discuss the practical and theoretical aspects of the LAL test. Please call if you have questions about using Pyrochrome®. We will replace any of our products that do not perform to product specifications; contact Customer Service before returning product.

To obtain a copy of the instructions for use (IFU) in English, please refer to the ACC website at http://www.acciusa.com/lal/productinserts/pyrochrome.html

Lysat d'amœbocytes de *limule*

PYROCHROME®

Fabriqué par :
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Téléphone : +1 (508) 540-3444
Fax : +1 (508) 540-8680
Assistance technique : +1 (800) 848-3248
Service clientèle : +1 (800) 525-8378

PN000856-fr Rev1 Licence des États-Unis nº 700 Janvier 2011

PYROCHROME®

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

Le test du lysat d'amœbocytes 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'U.S. Pharmacopeia (USP) pour le test de produit final de « médicaments injectables à 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 de l'USP (2) est le test LAL officiel référencé dans des monographies spécifiques de l'USP et est harmonisé avec les chapitres équivalents de la Pharmacopée européenne (EP) (3) et de la Pharmacopée japonaise (JP) (4).

Résumé du test

Le lysat d'amœbocytes de *limule* est un extrait aqueux de cellules sanguines (amœbocytes) de la limule *Limulus polyphemus*. En présence d'endotoxines, des facteurs du LAL sont activés en une cascade protéolytique qui entraîne le clivage d'un substrat peptidique artificiel incolore présent dans le Pyrochrome® LAL. Le clivage protéolytique du substrat libère de la paranitroaniline (pNA), une substance jaune qui absorbe à 405 nm. Pour réaliser le test, ajouter un volume de Pyrochrome® à un volume d'échantillon, puis incuber le mélange réactionnel 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 (5). 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 établir des courbes d'étalonnage en reportant 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. L'autre méthode est la méthode chromogène en point final, dans laquelle on mesure la quantité de pNA libérée après une période d'incubation fixe. On 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. Pour les échantillons qui absorbent à 405-410 nm, on peut utiliser une modification par diazotation. Dans cette méthode, la pNA (formé avec la méthode chromogène en point final) réagit avec un nitrite dans du HCl puis avec de la N-(1-naphthyl)-éthylènediamine (NEDA) pour former un dérivé magenta diazoté qui absorbe dans la plage 540-550 nm.

Les méthodes du test Pyrochrome® sont rapides, spécifiques, simples à réaliser et très sensibles. La limite de détection dépend de la méthode et de l'instrumentation utilisées ; la sensibilité peut atteindre 0,001 unités d'endotoxine (UE) par mL.

Historique et principe biologique

La coagulation du sang de *limule* a été décrite par Howell en 1885 (6). Dans les années 50, Bang a découvert au Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts É-U, que les bactéries gram-négatives provoquent la coagulation du sang de *limule* (7). Plus tard, Levin et Bang ont déterminé que la réaction est enzymatique et que les enzymes sont situées dans des granules des amœbocytes (8, 9). Ils ont montré que la coagulation est déclenchée par un composant structurel unique de la paroi cellulaire bactérienne appelé endotoxine ou lipopolysaccharide (10). Selon les connaissances actuelles, la réaction est une cascade d'étapes d'activation enzymatique aboutissant au clivage de la protéine, le coagulogène. Le produit insoluble du clivage du coagulogène, la coaguline, s'unit par interaction ionique. Si une quantité suffisante de coaguline est formée, une turbidité apparaît suivie par la formation d'un gel-caillot. Cette interaction constitue la base d'un test de détection des endotoxines, le test du lysat d'amœbocytes de *limule* (LAL). En 1977, des chercheurs japonais ont découvert que le LAL activé par des endotoxines entraîne également le clivage de petits peptides chromogènes qui comportent un site de clivage acide aminé similaire au coagulogène, et du paranitroanilide, un chromophore (11). Le clivage entraîne la libération de pNA, une substance jaune qui absorbe la lumière à 405 nm. Dans cette adaptation chromogène du test LAL, la concentration en coagulogène est réduite par dilution pour minimiser une interférence lors de l'ajout du substrat chromogène au LAL. Ainsi, quand on ajoute des endotoxines au réactif LAL chromogène, une coloration se forme et non une turbidité ou un gel-caillot. Dans toutes les versions du test LAL (gel-caillot, turbidimétrie et 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 (12, 13, 14).

Réactif

Le Pyrochrome® est conditionné sous la forme d'un lyophilisat, à raison de 3,2 mL/flacon. Il contient un extrait aqueux d'amœbocytes de *Limulus polyphemus*, un stabilisateur, des sels, un tampon et un substrat chromogène.

Le Pyrochrome® n'est pas étiqueté avec une sensibilité spécifique. La sensibilité d'un test donné (désignée λ) est la plus petite concentration d'endotoxines utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. La plus grande sensibilité, λ, du Pyrochrome® est de 0,001 UE/mL pour la méthode cinétique et de 0,005 UE/mL pour la méthode en point final. Le Pyrochrome® est exclusivement destiné à des fins diagnostiques *in vitro*. Il n'est pas destiné au diagnostic d'une endotoxémie chez l'humain. La toxicité du Pyrochrome® n'a pas été déterminée. On a cependant rapporté qu'un contact prolongé ou répété du LAL avec la peau a entraîné une réaction allergique de type I chez certaines personnes (15). Il faut donc prendre des précautions lors de la manipulation du Pyrochrome®.

Procédure de reconstitution :

1. Tapoter délicatement le flacon de Pyrochrome® pour faire tomber le produit en vrac 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 au travers du bouchon et ne pas le réutiliser. La présence d'une petite quantité de poudre de LAL sur le bouchon n'affecte pas le test.
2. Reconstituer le Pyrochrome® avec 3,2 mL de tampon Pyrochrome® ou de tampon Glucashield® (disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.). Pour obtenir une sensibilité de 0,001 UE/mL avec un lecteur de microplaque, il est nécessaire de reconstituer le Pyrochrome® avec du Glucashield®. Il est possible d'obtenir cette même sensibilité avec soit du tampon de reconstitution Pyrochrome®, soit du tampon Glucashield® dans un lecteur de tube. La solubilisation du lyophilisat prend quelques minutes ; il faut donc le réhydrater au moins 5 minutes avant l'utilisation. Tournoyer 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 avec du Parafilm M® et conserver au froid (entre 2 et 8 °C). Le Pyrochrome® doit être utilisé dans les 8 heures qui suivent la reconstitution.

Conditions de stockage

Le Pyrochrome® lyophilisé est relativement stable ; conservé correctement, il préserve toute son activité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Conserver le produit entre 2 et 8 °C. Une température supérieure à 37 °C peut entraîner une détérioration rapide du Pyrochrome® lyophilisé comme indiqué par une perte de 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 dans 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 filaments n'est pas indicatrice d'une contamination et n'affecte pas l'activité ; cependant, un précipité floconneux ou un net jaunissement indique une détérioration du réactif, qui ne doit pas être utilisé. Le Pyrochrome® reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé ; les flacons peuvent être conservés maximum 8 heures entre 2 et 8 °C. Noter qu'il peut être nécessaire d'utiliser un réactif fraîchement reconstitué pour obtenir une sensibilité maximale. Ne pas congeler le Pyrochrome® reconstitué.

Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons doivent être prélevés aseptiquement dans des conteneurs exempts d'endotoxines détectables. Pour minimiser l'adsorption d'endotoxines sur les surfaces du conteneur, il est recommandé d'utiliser des flacons en verre réutilisables dépyrogénés ou des flacons stériles jetables en polystyrène ou en polyéthylène téréphtalate (PET). Tous les conteneurs en plastique ne sont pas exempts d'endotoxines détectables. De plus, des substances diffusées par certains plastiques peuvent interférer avec le test. 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. L'eau de 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 testant la récupération d'une quantité connue d'endotoxines ajoutées. Le pH du mélange réactionnel (un volume d'échantillon, ou d'échantillon dilué, mélangé avec un volume égal de Pyrochrome®) doit être compris entre 6 et 8. Ajuster le pH de l'échantillon avec du HCl, du NaOH ou un tampon (exempt d'endotoxines détectables). Diluer du HCl ou du NaOH concentré avec de l'ERL de façon à obtenir une concentration appropriée et utiliser un volume n'entraînant pas de dilution significative de l'échantillon analysé. Si un précipité se forme dans l'échantillon lors de l'ajustement du pH, diluer l'échantillon (sans dépasser la DMV – voir la section « Limites de la procédure ») avant d'ajuster le pH. Ne pas ajuster le pH d'eau ou de sérum physiologique non tamponné. La dilution à elle seule peut permettre de remédier aux problèmes de pH.

Les substances qui dénaturent les protéines, chélatent les ions, se lient aux endotoxines ou modifient 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, par rapport à ce qui est attendu, 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 non stériles qui doivent être conservés ou transportés avant le test. Les échantillons censés contenir de faibles concentrations d'endotoxines doivent être testés pour une perte d'endotoxines pendant le stockage.

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®* (nº de référence C1500 seulement). Utiliser le tampon pour reconstituer le Pyrochrome® comme décrit plus haut.
3. *Tampon de reconstitution Glucashield®* (nº de référence CG1500 seulement). Utiliser le tampon pour reconstituer le Pyrochrome® comme décrit plus haut.
4. *Endotoxine étalon de contrôle* (EEC) - Kit de diazotation (CD060) uniquement : Chaque flacon d'EEC contient 10 ng. 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 solubilisation rapide. Après l'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. Procéder ensuite aux dilutions appropriées pour obtenir les concentrations désirées d'endotoxines. Mélanger à l'agitateur vortex entre les dilutions. Conservée entre 2 et 8 °C, l'EEC reconstituée reste stable pendant sept jours. Ne pas congeler l'EEC reconstituée.

   Chaque flacon d'EEC contient l'endotoxine dont l'activité a été déterminée par rapport à l'endotoxine étalon de référence (EER) des États-Unis et est indiquée sur le CA. L'endotoxine étalon de référence de l'USP (identique à l'EER) peut être obtenue auprès de l'U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.

   Remarque : Le CA et la puissance indiquée sur ce certificat sont spécifiques d'une combinaison du lot de Pyrochrome® et du lot d'EEC. Un lot donné d'EEC peut donner des puissances différentes (UE/ng) lors de tests avec différents lots de Pyrochrome® ou avec du Pyrotell ou du Pyrotell-T. De même, différents lots d'EEC montrent généralement des puissances différentes lors de tests avec le même lot de Pyrochrome®. **S'assurer d'utiliser la puissance et le CA corrects.**

   Utiliser l'EEC pour la préparation des concentrations d'endotoxine étalon qui permettent d'établir les courbes d'étalonnage, pour des contrôles positifs et pour des contrôles positifs de produit (contrôles d'interférence). Ne pas utiliser cette EEC de 10 ng/flacon comme contrôle de dépyrogénation.
5. *Réactifs de diazotation* - Kit de diazotation (CD060) uniquement : flacon 1a, HCl ; flacon 1, nitrite de sodium ; flacon 2, sulfamate d'ammonium ; flacon 3, NEDA. Reconstituer le flacon 1 avec l'ensemble du contenu du flacon 1a ; reconstituer le flacon 2 avec 4 mL d'eau ; reconstituer le flacon 3 avec 4 mL d'eau. Voir la section 5 ci-dessous pour la qualité d'eau requise.

Réactifs de test non fournis avec le Pyrochrome®

1. *Endotoxine étalon de contrôle* (EEC). (Associates of Cape Cod, Inc., numéro de référence EC010). Reconstituer l'EEC avec le volume spécifié sur le certificat d'analyse (CA indiquant la puissance de l'EEC) et comme indiqué dans la notice. Suivre les instructions de la notice pour l'utilisation et le stockage de l'endotoxine étalon. La puissance de l'EEC a été déterminée par rapport à l'endotoxine étalon de référence (EER) des États-Unis et est indiquée sur le CA. L'endotoxine étalon de référence de l'USP (identique à l'EER) peut être obtenue auprès de l'U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. **Remarque :** Le CA et la puissance indiquée sur ce certificat sont spécifiques d'une combinaison du lot de Pyrochrome® et du lot d'EEC. Un lot donné d'EEC peut donner des puissances différentes (UE/ng) lors de tests avec différents lots de Pyrochrome®, du Pyrotell ou d'autres marques de réactif LAL (1). De même, différents lots d'EEC montrent généralement des puissances différentes lors de tests avec le même lot de Pyrochrome®. **S'assurer d'utiliser la puissance et le CA corrects.**

   Utiliser l'EEC pour préparer les dilutions d'endotoxine étalon qui permettent d'établir les courbes d'étalonnage, pour les contrôles positifs et pour les contrôles positifs de produit (contrôles d'interférence).
2. *Eau pour réactif LAL* (ERL). Associates of Cape Cod, Inc. est l'un des fabricants recommandés (plusieurs tailles et configurations d'emballage sont disponibles). On peut également utiliser de l'eau stérile pour injection de l'USP exempte de bactériostatique ou de l'eau pour irrigation de l'USP, disponibles dans le commerce, à condition d'avoir démontré que ces eaux sont acceptables pour une utilisation comme ERL. La concentration maximale en endotoxines de l'eau stérile pour injection de l'USP n'est que de 0,25 UE/mL ; l'eau stérile pour injection peut donc contenir des endotoxines détectables et ne pas convenir à l'utilisation.

   Pour certifier que l'eau est acceptable comme ERL, il faut la tester comme échantillon avec un contrôle positif de produit (voir la section 1.c. dans la section « Contrôles »). Utiliser une ERL certifiée pour les dilutions des étalons et préparer les contrôles positifs (voir les sections 1.a. et 1.b. dans la section « Contrôles »). Établir une courbe d'étalonnage à partir des temps de réaction ou des tests en point final pour les étalons. 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 extrapolation de la courbe d'étalonnage au-dessous de la plus basse concentration d'endotoxines ; elle doit être significativement inférieure à celle de l'étalon à la plus faible concentration. En outre, la concentration d'endotoxines du contrôle positif de produit doit être à ± 25 % de celle du contrôle positif.
3. *Tampon Glucashield®*. Disponible auprès d'Associates of Cape Cod, Inc. (nº de référence GB051), ce tampon peut être utilisé à la place du tampon de reconstitution Pyrochrome® pour éviter une interférence des (1→3)-β-D-glucanes.
4. *Acide acétique à 50 %* (pour la méthode en point final). Préparer la solution en ajoutant un volume d'acide acétique glacial à un volume égal d'eau distillée ou d'eau obtenue par osmose inverse. (On peut utiliser de l'ERL, voir la section 2. ci-dessus, mais ce n'est pas obligatoire.)
5. *Eau* (pour la reconstitution des réactifs de diazotation uniquement). Toute source d'eau distillée (y compris l'ERL), d'eau désionisée ou d'eau obtenue par osmose inverse pour laboratoire est acceptable. Il n'est pas nécessaire que cette eau soit exempte d'endotoxines puisqu'elle est utilisée uniquement pour la diazotation.

Matériel et équipement

1. *Microplaques*. Microplaques couvertes de 96 puits (disponibles auprès d'Associates of Cape Cod, Inc., nº de référence CA961). Les plaques doivent être certifiées ou testées pour la contamination par des endotoxines et/ou des glucanes ; elles ne doivent provoquer ni inhibition, ni augmentation. Vérifier les microplaques avant de les utiliser et les jeter si elles sont rayées ou si d'autres interférences optiques sont remarquées sur les puits ou sur le bas des puits.
2. *Tubes à essai*. La méthode cinétique peut être réalisée sur un lecteur-incubateur de tube comme le Pyros Kinetix® Flex en utilisant des tubes de culture de 8 x 75 mm, en verre borosilicaté dépyrogéné (Associates of Cape Cod, Inc. nº de référence TK100). La méthode en point final peut également être réalisée dans des tubes de culture de 8 x 75 mm ou de 10 x 75 mm, en verre borosilicaté dépyrogéné (Associates of Cape Cod, Inc. nº de référence TK100 et TB050, respectivement).
3. *Lecteur optique* permettant une mesure à 405 nm, ou à 540-550 nm pour la méthode par diazotation. Pour la méthode cinétique, utiliser un lecteur-incubateur de microplaque, comme le BioTek® ELx808™ ou le Molecular Devices VersaMax™, ou un lecteur de tube comme le lecteur de tube Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc. nº de référence PKF32, PKF64 et PKF96).

   Pour la méthode en point final, utiliser un lecteur de microplaque pour la mesure des microplaques ou, si le test est réalisé dans les tubes, un spectrophotomètre avec des cuvettes adéquates.
4. *Incubateur* permettant de maintenir 37±1 °C (requis uniquement pour la méthode en point final). Il est recommandé d'utiliser un socle incubateur sec pour microplaques (ou tubes, selon le cas). (On peut utiliser un bain d'eau pour la méthode en point final en tube à essai.) Les incubateurs doivent distribuer uniformément la chaleur.
5. *Portoirs pour tubes à essai* pour tenir et/ou incuber les tubes de dilution et les tubes à essai.
6. *Pipettes*, micropipettes avec embouts de pipette (les pipettes multicanaux sont utiles en cas d'utilisation de microplaques) ou pipettes automatiques avec corps de seringue en plastique. Il est recommandé d'utiliser des pipettes et embouts jetables exempts d'endotoxines et de glucanes, des substances interférentes. Associates of Cape Cod, Inc. propose la gamme de produits Pyroclear®, certifiée exempte d'endotoxines et de glucanes interférentes.
7. *Agitateur de type vortex.*
8. *Parafilm M®* (American National Can™). Le côté en contact avec la feuille de papier est typiquement exempt d'endotoxines détectables.
9. *Tubes à essai* exempts d'endotoxines interférentes avec une capacité adéquate pour préparer les dilutions de l'étalon d'endotoxines et des échantillons analysés. Pour les conteneurs convenant aux dilutions, voir la section « Prélèvement et préparation des échantillons ».
10. *Étuve à air chaud* avec une capacité de chauffage à au moins 250 °C pour la dépyrogénation de la verrerie. Les cycles habituellement utilisés pour la dépyrogénation assurent que tous les articles placés dans l'étuve soient exposés au minimum pendant 30 minutes à 250 °C (2, 16, 17).

Contrôles

Les contrôles permettent d'assurer la validité du test. Les procédures recommandées sont décrites par la FDA (1) et l'USP (2), l'EP (3) et la JP (4).

1. Contrôles d'endotoxines.

a. **Série d'étalons d'endotoxines.** Pour chaque test, préparer une nouvelle série de dilutions à partir de la solution mère d'endotoxines. Ne pas utiliser des dilutions préparées antérieurement et conservées, à moins d'avoir validé la stabilité de la plage des concentrations. Pratiquer les dilutions en série géométrique pour obtenir la plage désirée des concentrations d'endotoxines. Les dilutions par deux sont recommandées pour la méthode en point final ; on peut utiliser des dilutions plus importantes pour la méthode cinétique. La plus faible concentration d'endotoxines dans toute série d'étalons est la limite de détection du test particulier ; elle est désignée par λ (**remarque** : des limites de détection de 0,005 et de 0,001 UE/mL sont possibles avec le Pyrochrome® en utilisant la méthode en point final et la méthode cinétique, respectivement). Pour obtenir la plage des étalons requise, utiliser le plus petit nombre possible de dilutions, avec des volumes de pipette adéquats afin d'optimaliser l'exactitude. Les dilutions peuvent être effectuées dans des tubes à essai constitués de verre ou d'un plastique adéquat, ou directement dans des microplaques. Les concentrations maximales détectées avec le Pyrochrome® dépendent de la méthode. Consulter les durées d'incubation recommandées disponibles pour le Pyrochrome® comme guide.

b. **Un contrôle positif** (concentration unique d'endotoxine étalon) doit être inclus si la série d'étalons (voir la section a. ci-dessus) n'est pas préparée de la même manière que les contrôles positifs de produit (voir la section c. ci-dessous). La concentration d'endotoxines du contrôle positif doit être égale à celle d'un étalon du milieu de la courbe d'étalonnage. Une valeur de 0,5 UE/mL devrait convenir pour des contrôles positifs inclus dans une série d'étalons comprenant des concentrations de 0,005, 0,05, 0,5, 5 et 50 UE/mL. Si un test ne comporte pas de série d'étalons, il faut inclure un contrôle positif pour vérifier que l'utilisation des paramètres d'une courbe d'étalonnage antérieure (archivée) convient au calcul des concentrations d'endotoxines. Pour des informations détaillées, se reporter aux directives de la FDA (1) dans la section « Routine Testing of Drugs by the LAL Test » (Test de routine des médicaments avec le test LAL). Le contrôle positif doit être préparé dans de l'eau de la même manière que le contrôle positif de produit (CPP) dans le produit.

c. Les contrôles positifs de produit sont des contrôles d'inhibition/augmentation ; il s'agit d'une dilution de l'échantillon ou de l'échantillon lui-même auquel on a ajouté de l'endotoxine étalon. La concentration des endotoxines ajoutées dans l'échantillon analysé doit être identique à celle du contrôle positif. Voir la section b. ci-dessus pour la sélection d'une concentration appropriée d'endotoxines pour le contrôle positif de produit. L'ajout d'endotoxines à l'échantillon est souvent qualifié de « dopage » (échantillon « dopé »).

2. Contrôles négatifs.

Des contrôles négatifs constitués d'ERL doivent être inclus dans chaque test.

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

Si un protocole de test a été développé auparavant pour le type d'échantillon à analyser, procéder à la dilution nécessaire pour le test et suivre les consignes de la section « Réalisation du test ». Si un protocole n'a pas été développé pour le type d'échantillon, procéder à une série de dilutions par dix de l'échantillon. Ne pas dépasser la dilution maximale valide du produit de plus d'un facteur 10. Se reporter à la section « Limites de la procédure » ci-dessous ou aux directives de la FDA (1) pour l'explication et le calcul de la dilution maximale valide (DMV) et de la concentration minimale valide (CMV). Préparer des dilutions appropriées de tous les échantillons avec un contrôle positif de produit pour chaque échantillon.

Réalisation du test

Observer une technique reproductible pour obtenir des résultats satisfaisants. Tous les contrôles et tous les échantillons doivent être testés au moins en double. Prendre des précautions pour éviter la contamination pendant la préparation du test. L'équipement doit être correctement étalonné et validé pour assurer des températures d'incubation uniformes.

1. Préparer l'instrumentation de test selon les besoins. En cas d'utilisation d'un système automatisé, cette phase comporte généralement une saisie des descripteurs des échantillons, la configuration des paramètres du test et l'allumage de l'incubateur réglé à 37 °C.
2. Ajouter au conteneur de réaction le volume approprié d'échantillon (contrôle négatif, étalon d'endotoxines, échantillon ou contrôle positif de produit) pour obtenir un rapport approprié avec l'ajout de Pyrochrome® (voir la section 3. ci-dessous).

   Série de tests dans un lecteur de microplaque : un rapport lysat/échantillon de 1/1 est utilisé. Pour des performances optimales, utiliser un volume de 0,05 mL d'échantillon pour les méthodes suivantes : cinétique, point final ou diazotation. Sinon, il est possible d'utiliser 0,1 mL pour la méthode cinétique et la méthode en point final, même s'il est recommandé d'utiliser 0,05 mL pour obtenir la sensibilité maximale ou pour une courbe d'étalonnage sur une grande plage (plage supérieure à trois logarithmes).

   Série de tests dans le lecteur de tube Pyros Kinetix® Flex : il est possible d'utiliser un rapport lysat/échantillon de 1/1 ou de 1/4. Un volume d'échantillon de 0,1 mL est requis pour les séries de tests utilisant un rapport réactif Pyrochrome® LAL/échantillon de 1/1. Pour les tests dans le lecteur de tube Pyros Kinetix® Flex qui utilisent un rapport réactif Pyrochrome® LAL/échantillon de 1/4, le volume d'échantillon doit être de 0,2 mL.
3. Ajouter le Pyrochrome® de manière appropriée, en fonction de la méthode et mélanger. Un mélange inadéquat est une cause fréquente de résultats de test insatisfaisants. La plupart des lecteurs de plaque disposent d'une fonction d'agitation.
   a. Pour une microplaque, un rapport lysat/échantillon de 1/1 est utilisé et le volume de Pyrochrome® ajouté est égal au volume d'échantillon (voir la section 2. ci-dessus ; en général, 0,05 mL). Ajouter le Pyrochrome® le plus rapidement possible à tous les échantillons et mélanger pendant 5 à 30 secondes. Déposer la plaque sur un socle incubateur (pour un test en point final) ou dans un lecteur-incubateur de microplaque (pour un test cinétique).
   b. Pour les méthodes utilisant des tubes à essai ou des cuvettes individuels, le volume de Pyrochrome® ajouté peut soit être égal au volume d'échantillon (0,1 mL dans un lecteur de tube Pyros Kinetix® Flex), soit correspondre à un quart du volume d'échantillon (0,05 mL dans un lecteur de tube Pyros Kinetix® Flex). Important : la durée de la réaction doit être la même pour tous les tubes. Dans le cas du lecteur de tube Pyros Kinetix® Flex, l'instrument détecte le tube à essai dès son insertion et démarre le chronométrage. Dans chaque conteneur de réaction à son tour, ajouter le Pyrochrome®, mélanger pendant environ 2 secondes et placer le conteneur dans l'incubateur (pour la méthode en point final) ou dans le lecteur de tube (pour la méthode cinétique).

      Que des microplaques ou des tubes à essai soient utilisés, une pipette automatique facilite l'ajout de Pyrochrome®.

      Prendre des précautions pour éviter la contamination du flacon de Pyrochrome® lors de la manipulation du réactif.
4. Lecture du résultat du test.
   a. Pour la méthode cinétique, laisser le test réagir jusqu'à ce que tous les échantillons soient incubés pendant une durée significativement plus longue que le temps nécessaire pour que la plus faible concentration d'endotoxine étalon atteigne la DO405 de réaction. Les systèmes de test automatisés arrêtent généralement le test après une période prédéfinie. Demander les durées d'incubation recommandées comme guide.
   b. Pour la méthode en point final, chronométrer précisément l'incubation, sortir la plaque ou les tubes à essai de l'incubateur, arrêter la réaction avec de l'acide acétique à 50 % (volume suffisant pour obtenir une concentration finale de 10 % d'acide acétique ; utiliser 0,025 mL pour un volume d'échantillon/Pyrochrome® de 0,05 mL) et lire la densité optique (DO) dans un spectrophotomètre ou un lecteur de microplaque (selon le cas) à 405 nm. Configurer le test et la mesure de manière à ce que la durée d'incubation soit identique (à ± 30 secondes près) pour chaque échantillon. La période d'incubation dépend de la plage des concentrations d'endotoxines désirée ; elle peut différer en fonction du lot de Pyrochrome®. Des tests préalables peuvent être nécessaires pour déterminer la durée d'incubation adéquate. Se reporter aux durées d'incubation recommandées comme guide.
   c. Pour la méthode en point final avec diazotation, sortir les tubes à essai ou la plaque de l'incubateur, arrêter la réaction en ajoutant 0,05 mL de la solution 1 (nitrite de sodium reconstitué avec du HCl). Agiter la plaque pour mélanger. En utilisant un nouvel embout de pipette, ajouter 0,05 mL de la solution 2 (sulfamate d'ammonium) dans chaque puits de réaction et mélanger. Enfin, ajouter 0,05 mL de la solution 3 (NEDA) dans chaque puits en utilisant un nouvel embout de pipette et mélanger. Une nette coloration (magenta) doit apparaître immédiatement. Lire les résultats du test à 540-550 nm. Configurer le test et la mesure de manière à ce que la durée d'incubation soit identique (à ± 30 secondes près) pour chaque échantillon. La période d'incubation dépend de la plage des concentrations d'endotoxines désirée ; elle peut différer en fonction du lot de Pyrochrome®.

Des tests préalables peuvent être nécessaires pour déterminer la durée d'incubation adéquate.

Résultats

1. Calculs préliminaires.

a. Pour la méthode cinétique, déterminer les temps pris par les échantillons pour atteindre un seuil de densité optique particulier (généralement 0,03 unités de DO) après avoir procédé à toutes les corrections de données. Les mesures de densité optique doivent être exprimées relativement à une mesure initiale considérée comme valant zéro unité de DO. Beaucoup de lecteurs de microplaque sont munis de logiciels qui procèdent à ces calculs. Le temps nécessaire pour atteindre la valeur de DO est appelé temps de réaction.

2. Établissement d'une courbe d'étalonnage.

a. Pour la méthode cinétique, établir une courbe d'étalonnage par régression du logarithme du temps de réaction en fonction du logarithme de la concentration d'endotoxines pour les étalons. L'équation de la droite de régression décrit la courbe d'étalonnage.

   À condition que la valeur absolue du coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage soit d'au moins 0,980 (voir le point 2. de la section « Interprétation » ci-dessous), il est possible d'utiliser une équation linéaire de régression polynomiale (c'est-à-dire quadratique) de second degré/ordre pour calculer les concentrations d'endotoxines.

b. Pour la méthode en point final, établir une courbe d'étalonnage en reportant les mesures de densité optique en fonction des concentrations d'endotoxine étalon.

3. Calcul des concentrations d'endotoxines.

Calculer les concentrations d'endotoxines de tous les échantillons (y compris les étalons et les contrôles) en utilisant l'équation d'une droite $Y = aX + b$ modifiée en $X = (Y – b) / a$

où :

Y = logarithme du temps de réaction (méthode cinétique), ou densité optique (méthode en point final)

X : Méthode cinétique : X = logarithme de la concentration d'endotoxines (il est nécessaire de déterminer l'antilogarithme de X pour obtenir la concentration d'endotoxines)
Méthode en point final : X = concentration d'endotoxines

a = pente de la droite

b = ordonnée à l'origine

Multiplier la concentration d'endotoxines calculée à partir de la droite d'étalonnage par le facteur de dilution de l'échantillon pour obtenir la concentration de l'échantillon initial non dilué.

Ces calculs sont souvent effectués par le logiciel du test d'endotoxine.

Interprétation

1. Pour que le test soit valide, la concentration d'endotoxines des contrôles négatifs (estimée par extrapolation de la courbe d'étalonnage) doit être significativement inférieure à la plus faible concentration d'étalon.
2. Le coefficient de corrélation pour la courbe d'étalonnage incluse dans le test doit avoir une valeur absolue d'au moins 0,980.
3. La concentration moyenne d'endotoxines mesurée des contrôles positifs (pour la vérification d'une courbe archivée) doit se situer à maximum 25 % de la concentration nominale. Par conséquent, si le contrôle positif contient 0,125 UE/mL, la concentration mesurée doit se situer entre 0,09375 et 0,15625 UE/mL.
4. Les concentrations d'endotoxines peuvent être rapportées uniquement pour la plage située entre la plus faible et la plus forte concentration d'endotoxine étalon. Les résultats des échantillons situés en dehors de la plage doivent être rapportés comme inférieurs à la plus faible concentration d'étalon (non détectables) ou supérieurs à la plus forte concentration d'étalon.

   Pour la méthode en point final, les concentrations valides d'endotoxines peuvent uniquement être calculées à partir des valeurs de DO qui se situent dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage.
5. Pour démontrer que l'échantillon n'interfère pas de manière significative avec la réaction LAL-endotoxines, la concentration d'endotoxines mesurée du contrôle positif de produit doit se situer entre 50 et 200 % de la concentration nominale des endotoxines provenant du dopage. Avant de déterminer si les endotoxines provenant du dopage sont récupérées dans ces limites, soustraire la concentration d'endotoxines mesurée dans l'échantillon non dopé. Par exemple, pour que l'échantillon soit considéré comme exempt d'interférence significative, la concentration d'endotoxines mesurée dans un contrôle positif de produit de 0,125 UE/mL (après soustraction des endotoxines éventuellement présentes dans l'échantillon non dopé) doit se situer dans la plage 0,0625-0,25 UE/mL (50 à 200 % de 0,125 UE/mL). Si la concentration d'endotoxines mesurée dans l'échantillon non dopé est de 0,028 UE/mL et que celle du contrôle positif de produit est de 0,163 UE/mL, la concentration d'endotoxines provenant du dopage vaut 0,163 – 0,028 = 0,135 UE/mL ; elle se situe dans la plage et, si toutes les autres exigences sont satisfaites, le test de l'échantillon est valide.

Limites de la procédure

La procédure est limitée par l'importance de la capacité d'inhibition ou d'augmentation de l'échantillon pendant le test. Si la procédure ne peut pas être validée (1, 2) à une concentration d'échantillon qui est supérieure à la concentration minimale valide (CMV), le test des endotoxines des bactéries utilisant le réactif LAL ne peut pas remplacer le test d'apyrogénicité de l'USP. La CMV est calculée comme suit :

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

où λ est exprimé en UE/mL, la dose d'échantillon en unités par kg de poids corporel, et la limite de tolérance aux endotoxines en UE/kg.

La dilution maximale valide (DMV) est la dilution d'échantillon contenant la CMV (1). Elle se calcule en divisant la concentration initiale de l'échantillon par la CMV.

La limite de tolérance aux endotoxines est de 0,2 UE/kg pour les médicaments administrés par voie intrathécale, et de 5 UE/kg pour tous les autres médicaments administrés par voie parentérale. La limite pour les dispositifs médicaux est exprimée par rapport au volume, en mL, d'extraction ou de rinçage obtenu comme décrit dans l'USP (18), sur base des limites pour les dispositifs. Pour les dispositifs qui n'entrent pas en contact avec le liquide céphalorachidien, la limite est de 20 UE/dispositif ; pour ceux qui entrent en contrat avec le liquide céphalorachidien, la limite est de 2,15 UE/dispositif. Conformément aux recommandations de la FDA (1), la limite pour les dispositifs liquides est la même que pour les médicaments.

Certaines protéases à sérine (comme la trypsine, les facteurs sanguins activés) entraînent un résultat faussement positif à moins qu'elles n'aient été dénaturées (par exemple, par un traitement thermique) avant le test. Les substances à coloration jaune comme un sérum animal, l'albumine et le plasma peuvent interférer avec un test chromogène basé sur la pNA. Pour ces produits, utiliser le test par diazotation (Associates of Cape Cod, Inc. nº de référence CD060). Une turbidité excessive dans un échantillon peut également interférer avec le test.

Valeurs attendues

Les endotoxines dans des échantillons peuvent être quantifiées dans la plage des concentrations d'endotoxine étalon utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. S'il est nécessaire de diluer l'échantillon pour éviter une inhibition ou une augmentation, la plus petite quantité d'endotoxine détectable augmente en conséquence. Même après une purification biochimique, les substances issues de sources biologiques peuvent encore contenir des taux mesurables d'endotoxines. Si la purification a été correctement effectuée et si l'eau n'a pas été contaminée après la production, l'eau obtenue par distillation, osmose inverse ou ultrafiltration peut contenir des concentrations d'endotoxines inférieures aux concentrations détectables.

Références

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, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
6. 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.
7. 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.
8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
13. 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.
14. 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.
15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
17. 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.
18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Notre équipe expérimentée est à votre disposition pour discuter des aspects pratiques et théoriques du test LAL. Veuillez nous contacter pour toute question relative à l'utilisation du Pyrochrome®. Nous nous engageons à remplacer tout produit dont les performances ne sont pas conformes aux spécifications ; contacter le service clientèle avant le renvoi du produit.

Pour obtenir un exemplaire de ce mode d'emploi en français, veuillez consulter le site web ACC http://www.acciusa.com/lal/productinserts/pyrochrome.html

Limulus-Amöbocyten-Lysat

PYROCHROME®

Hersteller:
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Telefon: +1 (508) 540-3444
Fax: +1 (508) 540-8680
Technischer Support: +1 (800) 848-3248
Kundendienst: +1 (800) 525-8378

PN000856-de Rev1 US-Lizenz Nr. 700 Januar 2011

PYROCHROME®

zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien (Lipopolysacchariden)

Der *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL) kann, bei Verwendung gemäß den Richtlinien der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) (1), als Ersatz für den Pyrogentest (Kaninchen-Fiebertest) der U.S. Pharmacopeia (USP) für die Endprodukt-Qualitätskontrolle von „injizierbaren Humanarzneimitteln (einschließlich biologischer Produkte), injizierbaren Tierarzneimitteln und Medizinprodukten" dienen. Der LAL-Test wird empfohlen zur quantitativen Bestimmung von Endotoxinen in Ausgangsstoffen für die Produktion, einschließlich Wasser, und zur Prozessüberwachung des Endotoxinspiegels. Der USP Bacterial Endotoxins Test (2) ist der amtliche LAL-Test, auf den einzelne USP-Monographien Bezug nehmen, und ist mit den entsprechenden Kapiteln der Europäischen Pharmakopöe (EP) (3) und der Japanischen Pharmakopöe (JP) (4) harmonisiert.

Zusammenfassung des Tests

Beim *Limulus*-Amöbocyten-Lysat handelt es sich um einen wässrigen Auszug der Blutzellen (Amöbocyten) des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. Bei Vorhandensein von Endotoxinen werden Faktoren im LAL aktiviert, und zwar in einer proteolytischen Kaskade, die zur Spaltung eines Substrats aus farblosem, künstlichem Peptid führt, welches im Pyrochrome®-LAL vorliegt. Die proteolytische Spaltung des Substrats setzt Paranitroanilin (pNA) frei, das gelblich ist und Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Zur Durchführung des Tests wird einem Volumenteil Probe ein Volumenteil Pyrochrome® zugesetzt und die Reaktionsmischung bei 37 °C inkubiert. Je höher die Endotoxinkonzentration in der Probe ist, umso schneller wird pNA produziert. Pyrochrome® kann auf zwei verschiedene Weisen zur quantitativen Endotoxinbestimmung verwendet werden (5). Bei der kinetischen Methode wird die Zeit bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion bei 405 nm bestimmt (die Anlaufzeit). Eine höhere Endotoxinkonzentration entspricht einer kürzeren Anlaufzeit. Für den Assay sind Spezialinstrumente notwendig, die mehrere Proben bei einer kontrollierten Temperatur (üblicherweise 37 °C) inkubieren und in regelmäßigen Abständen die optische Dichte messen können. Durch Auftragen der logarithmischen Anlaufzeit gegen die logarithmische Konzentration eines Standard-Endotoxins lassen sich Standardkurven erstellen, die zur Berechnung der Endotoxinkonzentration in den Proben dienen. Alternativ dazu kann die Menge an freigesetztem pNA nach einer festen Inkubationszeit gemessen werden. Dies ist die chromogene Endpunktmethode. Zur Bestimmung der Konzentration in den Proben wird eine Standardkurve verwendet, die durch Auftragen der gemessenen optischen Dichte über der bekannten Standard-Endotoxin-Konzentration erstellt wird. Bei Proben mit einer Extinktion im Bereich 405 nm bis 410 nm kann eine modifizierte Methode, die Azokupplung, verwendet werden. Bei dieser Methode lässt man pNA, das bei der chromogenen Endpunktmethode gebildet wurde, mit Nitrit in HCl und anschließend mit N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin (NEDA) reagieren, wobei sich ein diazotiertes, magentafarbiges Derivat mit einer Extinktion im Bereich 540 nm bis 550 nm bildet.

Die Pyrochrome®-Testmethoden sind schnell, spezifisch, einfach durchzuführen und hochsensitiv. Die Nachweisgrenze hängt von der verwendeten Methode und den eingesetzten Instrumenten ab und kann bis zu 0,001 Endotoxineinheiten (EU, Endotoxin Units) pro mL reichen.

Geschichte und biologisches Prinzip

Howell hat die Gerinnung von *Limulus*-Blut 1885 beschrieben (6). In den 1950er Jahren entdeckte Bang am Marine Biological Laboratory in Woods Hole, Massachusetts (USA), dass gramnegative Bakterien die Gerinnung von *Limulus*-Blut auslösen (7). Levin und Bang stellten nachfolgend fest, dass es sich dabei um eine enzymatische Reaktion handelt und dass die Enzyme sich in Körnchen in den Amöbocyten befinden (8, 9). Sie konnten nachweisen, dass die Gerinnung durch eine charakteristische Struktur der Zellwand des Bakteriums ausgelöst wird, das Endotoxin bzw. Lipopolysaccharid (10). Man geht heute davon aus, dass die Reaktion aus einer Kaskade von Enzymaktivierungsschritten besteht, die in der Spaltung des Proteins Koagulogen enden. Das unlösliche Spaltprodukt von Koagulogen (das Koagulin) verfestigt sich durch Ioneninteraktion. Bildet sich genügend Koagulin, führt dies zur Trübung und anschließend zur Bildung eines Gel-Clot. Diese Wechselwirkung ist die Grundlage für einen Assay auf Endotoxine, der als *Limulus*-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL) bezeichnet wird. Im Jahre 1977 entdeckten japanische Forscher, dass endotoxin-aktiviertes LAL auch kleine chromogene Peptide spalten kann, die eine Aminosäure-Spaltstelle ähnlich dem Koagulogen und dem Chromophor Paranitroanilid enthalten (11). Die Spaltung setzt pNA frei, das gelblich ist und Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Bei dieser chromogenen Adaption des LAL-Assays wird die Koagulogen-konzentration durch Verdünnung herabgesetzt, um die Interferenz bei der Zugabe des chromogenen Substrats zum LAL zu minimieren. Daher führt die Zugabe von Endotoxinen zu chromogenem LAL-Reagens vorzugsweise zur Farbbildung und nicht zur Trübung oder Bildung eines Gel-Clots. Für alle Versionen des LAL-Assays (Gel-Clot, turbidimetrisch und chromogen) gilt, dass der Endpunkt (Gel-Clot, Trübung oder Färbung) umso schneller erreicht wird, je mehr Endotoxine vorhanden sind. Näheres zu den LAL-Assaytypen, der Reaktion und den Anwendungen findet sich in der Literatur (12, 13, 14).

Reagens

Pyrochrome® ist als Lyophilisat in Packungen zu 3,2 mL/Fläschchen erhältlich. Es enthält einen wässrigen Auszug von *Limulus-polyphemus*-Amöbocyten, Stabilisator, Salze, Puffer und ein chromogenes Substrat.

Pyrochrome® ist nicht mit einer bestimmten Empfindlichkeit ausgezeichnet. Die Empfindlichkeit im Test (mit λ bezeichnet) ist jeweils die niedrigste Endotoxinkonzentration, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet wurde. Die höchste Empfindlichkeit (λ) von Pyrochrome® beträgt 0,001 EU/mL in einem kinetischen Assay und 0,005 EU/mL in einem Endpunktassay. Pyrochrome® dient nur zur *In-vitro*-Diagnostik. Es ist nicht zur Diagnose einer Endotoxämie beim Menschen bestimmt. Die Toxizität von Pyrochrome® ist nicht bestimmt worden. Jedoch hat der langdauernde oder wiederholte Hautkontakt mit LAL bei manchen Personen zu einer allergischen Reaktion vom Typ I geführt (15). Beim Umgang mit Pyrochrome® ist daher Vorsicht geboten.

Vorgehen zur Rekonstitution:

1. Pyrochrome®-Fläschchen leicht antippen, damit sich loses Material auf dem Boden des Fläschchens absetzt. Durch Anheben des grauen Stopfens das Vakuum aufheben. Dabei die Mündung des Fläschchens nicht kontaminieren. Den Stopfen abnehmen und entsorgen. Nicht durch den Stopfen injizieren oder diesen wieder verwenden. Eine kleine, am Stopfen verbleibende Menge LAL-Pulver beeinträchtigt den Test nicht.
2. Pyrochrome® mit 3,2 mL Pyrochrome®-Puffer bzw. Glucashield®-Puffer (einzeln erhältlich von Associates of Cape Cod, Inc.) rekonstituieren. Zur Erzielung einer Empfindlichkeit von 0,001 EU/mL mit einem Plattenfotometer muss Pyrochrome® mit Glucashield® rekonstituiert werden. Wenn ein Röhrchen-Lesegerät verwendet wird, ist diese Empfindlichkeit sowohl mit Pyrochrome®-Rekonstitutionspuffer als auch mit Glucashield®-Puffer zu erzielen. Es dauert einige Minuten, bis sich die Tablette aufgelöst hat. Deswegen mindestens 5 Minuten vor der Anwendung rehydrieren. Das Fläschchen zur Homogenisierung schwenken, jedoch heftiges Schütteln vermeiden, das übermäßige Schaumbildung und Empfindlichkeitsverlust verursachen kann. Das Fläschchen mit Parafilm M® abdecken und bei Nichtgebrauch kalt (bei 2 °C bis 8 °C) lagern. Pyrochrome® muss innerhalb von 8 Stunden nach der Rekonstitution verwendet werden.

Lagerbedingungen

Gefriergetrocknetes Pyrochrome® ist relativ stabil und behält bei sachgemäßer Lagerung seine volle Aktivität bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verwendbarkeitsdatum. Produkt bei 2 °C bis 8 °C lagern. Temperaturen über 37 °C können die rasche Zersetzung von gefriergetrocknetem Pyrochrome® verursachen, was sich als Empfindlichkeitsverlust und deutliche Gelbfärbung des Produktes äußert. Pyrochrome® wird zum Schutz vor hohen Temperaturen in Isolierbehältern versandt. Pyrochrome® ist vor der Rekonstitution lichtempfindlich und muss dunkel gelagert werden.

Nach Rekonstitution liegt Pyrochrome® normalerweise in einer klaren und leicht opaleszierenden Lösung vor. Einzelne Chargen weisen gelegentlich eine leichte, uniforme Trübung auf. Das Vorliegen kleiner Fasern oder Stränge ist kein Hinweis auf Kontamination oder eine Beeinträchtigung der Aktivität; Ausflockung oder eine deutliche Gelbfärbung weist allerdings auf eine Zersetzung des Reagens hin und das Reagens darf in diesem Fall nicht verwendet werden. Rekonstituiertes Pyrochrome® ist weniger stabil als das gefriergetrocknete Produkt. Die Fläschchen dürfen bis zu 8 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Zu beachten ist, dass die maximale Empfindlichkeit gegebenenfalls nur mit frisch rekonstituiertem Reagens erreicht wird. Rekonstituiertes Pyrochrome® darf nicht eingefroren werden.

Probennahme und -vorbereitung

Proben sind aseptisch in Behälter zu nehmen, die keine nachweisbaren Endotoxine enthalten. Zur Minimierung der Adsorption von Endotoxinen an die Behälteroberfläche werden wieder verwendete, entpyrogenisierte Glasbehälter oder sterile Einweg-Kunststoffbehälter aus Polystyrol oder Polyethylenterephthalat (PET) empfohlen. Kunststoffbehälter sind nicht grundsätzlich frei von nachweisbaren Endotoxinen. Außerdem können lösliche Substanzen aus manchen Kunststoffen den Test stören. Das Laborgeschirr muss auf seine Eignung getestet werden. Dazu Behälter zufällig aus einer Charge auswählen, mit einem kleinen Volumen LAL-Reagenswasser (LRW) eine Stunde lang bei Raumtemperatur ausspülen und das Spülwasser wie eine Probe testen. Die Endotoxinkonzentration im Spülwasser muss erheblich unter der Konzentration des niedrigsten verwendeten Standards liegen. Auch darf das Spülwasser den Test weder hemmen noch fördern, was durch die Wiederfindung einer bekannten Dotierung mit Endotoxinen bestimmt wird. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches (ein Volumenteil Probe bzw. verdünnte Probe gemischt mit dem gleichen Volumen Pyrochrome®) muss bei 6 bis 8 liegen. Den pH-Wert der Probe mit HCl, NaOH oder Puffer (keine nachweisbaren Endotoxine enthaltend) einstellen. Konzentrierte HCl oder NaOH mit LRW auf eine entsprechende Konzentration verdünnen und ein Volumen anwenden, das nicht zu einer signifikanten Verdünnung der Testprobe führt. Falls sich bei der pH-Einstellung in der Probe ein Niederschlag bildet, die Probe vor der pH-Einstellung verdünnen (dabei die hgV nicht überschreiten – siehe „Grenzen des Verfahrens"). Den pH-Wert von ungepufferter Kochsalzlösung bzw. Wasser nicht einstellen. Die Verdünnung selbst kann eventuell Probleme mit dem pH-Wert lösen.

Substanzen, die Proteine denaturieren, Chelatkomplexe mit Ionen bilden, Endotoxine binden oder den hydrophoben Charakter der Endotoxine verändern, können den Test stören. Die Interferenz äußert sich u.U. als Wiederfindung von erheblich größeren oder kleineren Endotoxinmengen, als nach Zugabe einer bekannten Menge an Standard-Endotoxin zur Probe zu erwarten ist (siehe „Grenzen des Verfahrens"). In den meisten Fällen führt eine Verdünnung der Probe zu einer verminderten Konzentration und Aktivität der Störsubstanzen bei weiterhin gültigen Testergebnissen. Die geeigneten Kontrollen und Verdünnungswerte werden im Abschnitt „Testverfahren" besprochen. Proben sind so bald wie möglich nach der Entnahme zu testen. Es kann ratsam sein, unsterile Proben, die vor dem Test gelagert oder verschickt werden sollen, einzufrieren. Proben mit einer niedrigen erwarteten Endotoxinkonzentration sollten auf Endotoxinminderung während der Lagerung getestet werden.

Testverfahren

Mit Pyrochrome® gelieferte Testreagenzien

1. *Pyrochrome®* (siehe Beschreibung oben unter „Reagens" und „Vorgehen zur Rekonstitution").
2. *Pyrochrome®-Rekonstitutionspuffer* (nur Katalognummer C1500). Den Puffer wie oben beschrieben zur Rekonstitution von Pyrochrome® verwenden.
3. *Glucashield®-Rekonstitutionspuffer* (nur Katalognummer CG1500). Den Puffer wie oben beschrieben zur Rekonstitution von Pyrochrome® verwenden.
4. *Kontroll-Standard-Endotoxin* (KSE) – nur Diazo-Kit (CD060): Jedes Fläschchen KSE enthält 10 ng. Das KSE mit dem im Analysezertifikat (AZ, gibt die Wirkstärke des KSE an) angegebenen Volumen rekonstituieren. Das KSE ist speziell auf leichte Lösbarkeit ausgelegt. Fläschchen nach der Zugabe von LRW 30 bis 60 Sekunden lang im Vortex mischen. Das KSE ist nunmehr gebrauchsfertig. Wird es nicht sofort verwendet, das Fläschchen vor der Verwendung erneut 30 Sekunden lang im Vortex mischen. Dann die Verdünnungen herstellen, die den gewünschten Endotoxinkonzentrationen entsprechen. Zwischen den Verdünnungsschritten im Vortex mischen. Bei Lagerung zwischen 2 °C und 8 °C ist rekonstituiertes KSE sieben Tage lang stabil. Rekonstituiertes KSE nicht einfrieren.

   Jedes Fläschchen KSE enthält Endotoxin, dessen Aktivität in Bezug auf das US-Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) bestimmt wurde und auf dem AZ angegeben ist. Der Endotoxin-Referenzstandard nach USP (ident mit RSE) kann von U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., bezogen werden.

   Hinweis: Das AZ und die darauf angegebene Wirkstärke gehören zu einer bestimmten Kombination von Pyrochrome®- und KSE-Charge. Die gleiche Charge KSE kann beim Test mit Pyrochrome® aus verschiedenen Chargen bzw. mit Pyrotell oder Pyrotell-T u.U. verschiedene Wirkstärken (in EU/ng) aufweisen. Ebenso hat KSE aus verschiedenen Chargen beim Test mit Pyrochrome® aus der gleichen Charge wahrscheinlich verschiedene Wirkstärken. **Darauf achten, dass das richtige AZ und die richtige Wirkstärke verwendet werden.**

   Das KSE zur Zubereitung von Standard-Endotoxinkonzentrationen verwenden, mit denen Standardkurven erstellt werden und die als Positivkontrollen und Produkt-Positivkontrollen (Interferenzkontrollen) dienen. Dieses KSE (10 ng/Fläschchen) nicht als Entpyrogenisierungskontrolle verwenden.
5. *Diazo-Reagenzien* – nur Diazo-Kit (CD060): Fläschchen 1a: HCl; Fläschchen 1: Natriumnitrit; Fläschchen 2: Ammoniumsulfamat; Fläschchen 3: NEDA. Fläschchen 1 mit dem gesamten Inhalt von Fläschchen 1a rekonstituieren. Fläschchen 2 mit 4 mL Wasser rekonstituieren. Fläschchen 3 mit 4 mL Wasser rekonstituieren. Zur erforderlichen Wasserqualität siehe Punkt 5 unten.

Nicht mit Pyrochrome® gelieferte Testreagenzien

1. *Kontroll-Standard-Endotoxin* (KSE). (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer EC010). Das KSE mit dem im Analysezertifikat (AZ, gibt die Wirkstärke des KSE an) angegebenen Volumen und nach den Anweisungen in der Packungsbeilage rekonstituieren. Die Anweisungen in der Packungsbeilage zur Verwendung und Lagerung von Standard-Endotoxin befolgen. Die Wirkstärke des KSE wurde in Bezug auf das US-Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) bestimmt und ist auf dem AZ angegeben. Der Endotoxin-Referenzstandard nach USP (ident mit RSE) kann von U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., bezogen werden. **Hinweis:** Das AZ und die darauf angegebene Wirkstärke gehören zu einer bestimmten Kombination von Pyrochrome®- und KSE-Charge. Die gleiche Charge KSE kann beim Test mit Pyrochrome® aus verschiedenen Chargen bzw. mit Pyrotell oder LAL-Reagenzien anderer Hersteller u.U. verschiedene Wirkstärken (in EU/ng) aufweisen (1). Ebenso hat KSE aus verschiedenen Chargen beim Test mit Pyrochrome® aus der gleichen Charge wahrscheinlich verschiedene Wirkstärken. **Darauf achten, dass das richtige AZ und die richtige Wirkstärke verwendet werden.**

   Das KSE zur Zubereitung von Standard-Endotoxinverdünnungen verwenden, mit denen Standardkurven erstellt werden und die als Positivkontrollen und Produkt-Positivkontrollen (Interferenzkontrollen) dienen.
2. *LAL-Reagenswasser* (LRW). Empfohlene Bezugsquellen: Associates of Cape Cod, Inc. (verschiedene Packungsgrößen und -konfigurationen erhältlich) sowie andere. Im Handel erhältliches steriles Wasser für Injektionszwecke (steriles WfI) nach USP ohne Bakteriostatika oder Wasser zur Irrigation nach USP kann verwendet werden, vorausgesetzt, es ist nachweislich zur Verwendung als LRW geeignet. Der Endotoxin-Grenzwert für steriles WfI nach USP beträgt lediglich 0,25 EU/mL. Daher kann steriles WfI nachweisbare Mengen Endotoxine enthalten und zum Gebrauch ungeeignet sein.

   Zum Nachweis der Eignung von Wasser als LRW muss es wie eine Probe mit einer Produkt-Positivkontrolle getestet werden (siehe Punkt 1.c. im Abschnitt „Kontrollen"). Zur Verdünnung von Standards und zur Zubereitung von Positivkontrollen zertifiziertes LRW verwenden (siehe Punkte 1.a. und 1.b. unter „Kontrollen"). Aus den Anlaufzeiten oder den Endpunktassays für die Standards eine Standardkurve erstellen. Der Korrelationskoeffizient muss mindestens 0,980 betragen (Absolutwert). Die Endotoxinkonzentration des getesteten Wassers lässt sich durch Extrapolation der Standardkurve unterhalb der niedrigsten Endotoxinkonzentration abschätzen und muss erheblich unter der des niedrigsten Standards liegen. Außerdem muss die Endotoxinkonzentration der Produkt-Positivkontrolle innerhalb von ± 25% des Wertes einer Positivkontrolle liegen.
3. *Glucashield®-Puffer.* Erhältlich bei Associates of Cape Cod, Inc. (Katalognummer GB051). Kann an Stelle des Pyrochrome®-Rekonstitutionspuffers verwendet werden, um Störungen durch (1→3)-Beta-D-Glukane zu beheben.
4. *50%ige Essigsäure* (für die Endpunktmethode). Durch Zugabe von einem Volumenteil Eisessig zu einem gleichen Volumen destilliertem oder Umkehrosmose-Wasser zubereiten. (LRW – siehe oben unter 2. – kann verwendet werden, ist jedoch nicht notwendig.)
5. *Wasser* (nur für die Rekonstitution der Azokupplungsreagenzien). Zulässig sind alle Laborquellen für destilliertes (einschließlich LRW), entionisiertes oder Umkehrosmose-Wasser. Dieses Wasser muss nicht endotoxinfrei sein, da es nur für die Azokupplungschemikalien verwendet wird.

Material und Ausrüstung

1. *Mikrotiterplatten.* Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und Abdeckung (erhältlich bei Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer CA961). Die Mikrotiterplatten müssen hinsichtlich des Endotoxin- bzw. Glukangehaltes zertifiziert sein oder getestet werden und dürfen den Test weder hemmen noch fördern. Mikrotiterplatte vor Verwendung überprüfen und Platte verwerfen, falls Kratzer oder andere optische Interferenzen am Boden der Vertiefungen (innen oder außen) beobachtet werden.
2. *Reaktionsröhrchen.* Kinetische Assays können mit einem Röhrchen-Lesegerät mit Inkubator, beispielsweise mit Pyros Kinetix® Flex, unter Verwendung von entpyrogenisierten Kulturröhrchen der Größe 8 x 75 mm aus Borosilikatglas (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer TK100) durchgeführt werden. Die Endpunkt-Assays können in entpyrogenisierten Kulturröhrchen der Größe 8 x 75 mm oder 10 x 75 mm aus Borosilikatglas (Associates of Cape Cod, Inc., Katalognummer TK100 bzw. TB050) durchgeführt werden.
3. *Fotometer*, das bei 405 nm (bzw. 540 nm bis 550 nm bei der Azomethode) ablesen kann. Bei Anwendung der kinetischen Methode ein Plattenfotometer mit Inkubator wie beispielsweise das ELx808™ von BioTek® oder das VersaMax™ von Molecular Devices oder ein Röhrchen-Lesegerät wie das Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc. Katalognummer PKF32, PKF64 und PKF96) verwenden.

   Für die Endpunktmethode ein Plattenfotometer zur Ablesung der Mikrotiterplatten verwenden oder, wenn der Test in Röhrchen durchgeführt wird, ein Spektrofotometer mit entsprechenden Küvetten.
4. *Inkubator*, der 37±1 °C einhalten kann (nur für die Endpunktmethoden notwendig). Ein Trocken-Blockinkubator für Mikrotiterplatten (bzw. Röhrchen) wird empfohlen. (Für die Endpunktmethode mit Teströhrchen kann ein Wasserbad verwendet werden.) Die Inkubatoren sollten eine nachweislich uniforme Wärmeverteilung aufweisen.
5. *Teströhrchenhalter* zum Halten bzw. zur Inkubation von Verdünnungs- und Reaktionsröhrchen.
6. *Pipetten*, Mikropipetten mit Pipettenspitzen (bei der Anwendung von Mikrotiterplatten sind Mehrkanalpipetten hilfreich) oder Mehrkanalpipetten mit Spritzenzylinder aus Kunststoff. Empfohlen werden Einwegpipetten und -spitzen, die frei von störenden Endotoxinen bzw. Glukanen sind. Associates of Cape Cod, Inc., bietet die Produktlinie Pyroclear® an, die per Zertifikat frei von störenden Endotoxinen bzw. Glukanen ist.
7. *Vortex-Mixer.*
8. *Parafilm M®* (American National Can™). Die dem Schutzpapier zugewandte Seite ist typischerweise frei von nachweisbaren Endotoxinen.
9. *Teströhrchen*, die frei von störenden Endotoxinen und ausreichend groß sind, um Endotoxinstandards bzw. Proben darin zu verdünnen. Angaben zu Behältern, die für Verdünnungen geeignet sind, siehe unter „Probennahme und -vorbereitung".
10. *Heißluftofen*, der bis auf mindestens 250 °C aufheizt, zur Entpyrogenisierung von Glasartikeln. Die üblichen Entpyrogenisierungszyklen gewährleisten, dass alle Artikel im Ofen mindestens 30 Minuten lang einer Temperatur von mindestens 250 °C ausgesetzt werden (2, 16, 17).

Kontrollen

Kontrollen sind für einen gültigen Test zwingend notwendig. Die FDA (1) und die USP (2), EP (3) und JP (4) haben empfohlene Verfahren ausgearbeitet.

1. Endotoxinkontrollen.

a. **Endotoxinstandardreihe.** Für jeden Test einen neuen Satz Verdünnungen aus der Stamm-Endotoxinlösung zubereiten. Zuvor zubereitete und eingelagerte Verdünnungen dürfen nur verwendet werden, wenn die Stabilität dieses Konzentrationsbereiches nachgewiesen ist. Verdünnungen in geometrischer Reihe herstellen, so dass der erforderliche Endotoxin-Konzentrationsbereich erzielt wird. Für die Endpunktmethoden empfiehlt sich die Verdünnung auf das Doppelte. Für die kinetische Methode können höhere Verdünnungen verwendet werden. Die niedrigste Endotoxinkonzentration einer Standardreihe bildet jeweils die Nachweisgrenze des einzelnen Tests und wird mit λ bezeichnet (**Hinweis:** Bei Endpunkt- und kinetischen Tests sind mit Pyrochrome® Nachweisgrenzen von 0,005 bzw. 0,001 EU/mL möglich). Bei der Herstellung der erforderlichen Standardreihe die geringstmögliche Anzahl Verdünnungen und sachgemäße Pipettenvolumina verwenden, um höchstmögliche Genauigkeit zu erreichen. Die Verdünnungen können in Glas- oder geeigneten Kunststoffröhrchen oder direkt in einer Mikrotiterplatte hergestellt werden. Die mit Pyrochrome® nachweisbaren Maximalkonzentrationen hängen von der Methode ab. Als Richtwert gelten die für Pyrochrome® erhältlichen empfohlenen Inkubationszeiten.

b. **Eine Positivkontrolle** (eine einzelne Standard-Endotoxin-Konzentration) ist mitzuführen, wenn die Standardreihe (siehe oben unter a.) nicht auf die gleiche Weise wie die Produkt-Positivkontrollen zubereitet wird (siehe unten unter c.). Die Endotoxinkonzentration der Positivkontrolle sollte derjenigen eines Standards aus der Mitte der Standardkurve entsprechen. Ein Wert von 0,5 EU/mL wäre angemessen für Positivkontrollen, die mit einer Standardreihe aus den Konzentrationen 0,005, 0,05, 0,5, 5 und 50 EU/mL mitgeführt werden. Wird in einem Test keine Standardreihe mitgeführt, dann muss eine Positivkontrolle mitgeführt werden, um zu bestätigen, dass die Parameter einer vorherigen (archivierten) Standardkurve zur Berechnung von Endotoxinkonzentrationen verwendet werden können. Einzelheiten sind in der FDA-Richtlinie (1) im Abschnitt „Routine Testing of Drugs by the LAL Test" zu finden. Die Positivkontrolle wird auf die gleiche Weise mit Wasser zubereitet wie die Produkt-Positivkontrolle mit Produkt.

c. Produkt-Positivkontrollen sind Hemm-/Förderkontrollen und bestehen aus der Probe oder verdünnten Probe mit einem Zusatz von Standard-Endotoxin. Die Konzentration des Endotoxinzusatzes in der Probe muss der Konzentration der Positivkontrolle entsprechen. Zur Auswahl der geeigneten Endotoxinkonzentration für die Produkt-Positivkontrolle siehe Abschnitt b. oben. Der Endotoxinzusatz wird oft als „Dotierung" bezeichnet.

2. Negativkontrollen.

Negativkontrollen in Form von LRW müssen bei jedem Test mitgeführt werden.

Probenvorbereitung – Bestimmung der Testverdünnung

Wenn bereits ein Testprotokoll für den zu testenden Probentyp entwickelt wurde, die für den Assay 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 höchste gültige Verdünnung des Produktes höchstens um den Faktor 10 überschreiten. (Erläuterungen und Rechenbeispiele zur höchsten gültigen Verdünnung [hgV] und niedrigsten gültigen Konzentration [ngK] sind im Abschnitt „Grenzen des Verfahrens" unten oder in der FDA-Richtlinie [1] zu finden.) Zweckdienliche Verdünnungen aller Proben zubereiten, jeweils mit einer Produkt-Positivkontrolle.

Testdurchführung

Zum Erreichen zufriedenstellender Ergebnisse ist eine gleichbleibende Technik notwendig. Alle Kontrollen und Proben müssen mindestens zweifach getestet werden. Bei der Vorbereitung des Tests ist mit Vorsicht vorzugehen, um eine Kontamination zu vermeiden. Zur Gewährleistung einheitlicher Inkubationstemperaturen müssen alle Geräte entsprechend kalibriert und qualifiziert 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, sodass beim Zusatz von Pyrochrome® ein adäquates Verhältnis zustande kommt (siehe 3. unten).

   Tests, die mit dem Plattenfotometer durchgeführt werden: ein Verhältnis von Lysat zu Probe von 1:1 verwenden. Zur Erzielung der bestmöglichen Leistung bei allen derartigen Methoden (kinetische, Endpunkt- oder Azokupplungsmethode) ein Volumen von 0,05 mL Probe verwenden. Bei der kinetischen und Endpunktmethode kann auch ein Volumen von 0,1 mL verwendet werden. Zur Erzielung der maximalen Empfindlichkeit oder bei einer Standardkurve über einen großen Bereich (Bereich größer als drei Zehnerpotenzen) werden aber 0,05 mL empfohlen.

   Tests, die mit dem Röhrchen-Lesegerät Pyros Kinetix® Flex durchgeführt werden: das Verhältnis von Lysat zu Probe kann entweder 1:1 oder 1:4 betragen. Bei Durchführung von Tests unter Verwendung eines Verhältnisses von 1:1 zwischen Pyrochrome®-LAL-Reagens und Probe ist ein Probenvolumen von 0,1 mL erforderlich. Bei Durchführung von Tests mit dem Röhrchen-Lesegerät Pyros Kinetix® Flex, bei denen ein Verhältnis von 1:4 zwischen Pyrochrome®-LAL-Reagens und Probe eingesetzt wird, sollte das Probenvolumen 0,2 mL betragen.
3. Entsprechend der Methode Pyrochrome® zusetzen und mischen. Unbefriedigende Testergebnisse sind oft auf unzureichendes Mischen zurückzuführen. Die meisten Plattenlesegeräte verfügen über eine Schüttelfunktion.
   a. Bei Verwendung einer Mikrotiterplatte beträgt das Verhältnis zwischen Lysat und Probe 1:1 und das zugesetzte Volumen von Pyrochrome® entspricht dem Probenvolumen (siehe Punkt 2. oben; typischerweise 0,05 mL). 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 Plattenfotometer mit Inkubator (bei einem kinetischen Test) stellen.
   b. Bei Methoden, bei denen einzelne Reaktionsröhrchen oder Küvetten verwendet werden, kann das zugesetzte Volumen von Pyrochrome® entweder dem Probenvolumen entsprechen (0,1 mL bei Verwendung eines Röhrchen-Lesegeräts Pyros Kinetix® Flex) oder ein Viertel des Probenvolumens betragen (0,05 mL bei Verwendung eines Röhrchen-Lesegeräts Pyros Kinetix® Flex). Wichtig: Die Reaktionszeit sollte in allen Röhrchen gleich sein. Bei Verwendung des Röhrchen-Lesegeräts Pyros Kinetix® Flex wird das das Reaktionsröhrchen nach Einführung in das Gerät erkannt und die Zeitmessung in Gang gesetzt. Pyrochrome® der Reihe nach jedem Reaktionsgefäß zusetzen, etwa 2 Sekunden lang mischen und das Gefäß in das Inkubationsgerät (bei Endpunkttests) oder das Röhrchen-Lesegerät (bei kinetischen Tests) stellen.

      Unabhängig davon, ob Mikrotiterplatten oder Reaktionsröhrchen verwendet werden, ist eine Mehrkanalpipette für die Zugabe von Pyrochrome® hilfreich.

      Das Reagens ist mit Vorsicht zu behandeln, um eine Kontamination des Pyrochrome®-Fläschchens zu vermeiden.
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 Standard-Endotoxin-Konzentration den Anlauf-OD405-Wert erreicht hat. Automatische Testsysteme brechen üblicherweise den Test nach einer zuvor eingestellten Dauer ab. Die empfohlenen Inkubationszeiten als Richtwert anfordern.
   b. Bei der Endpunktmethode die Inkubationszeit genau messen, die Platte bzw. die Reaktionsröhrchen aus dem Inkubator nehmen, die Reaktion 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 Spektrofotometer bzw. Plattenfotometer 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 durch Zugabe von 0,05 mL Lösung 1 (mit HCl rekonstituiertes Natriumnitrit) stoppen. Zum Mischen die Platte agitieren. Mit einer neuen Pipettenspitze in jede Reaktionskavität 0,05 mL Lösung 2 (Ammoniumsulfamat) geben und mischen. Abschließend mit einer neuen Pipettenspitze in jede Kavität 0,05 mL Lösung 3 (NEDA) geben und mischen. 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. Plattenfotometer verfügen oft über Software, die diese Berechnungen vornimmt. Die Zeit bis zum Erreichen des OD-Wertes heißt Anlaufzeit.

2. Eine Standardkurve erstellen.

a. Bei der kinetischen Methode wird eine Standardkurve erstellt durch Regression der logarithmischen Anlaufzeit über der logarithmischen Endotoxinkonzentration der Standards. Die Gleichung für die Regressionsgerade beschreibt die Standardkurve.

   Vorausgesetzt, dass der Absolutwert des Korrelationskoeffizienten der Standardkurve mindestens 0,980 beträgt (siehe nachstehenden Punkt 2. unter „Interpretation") kann eine polynomiale Regressionsgleichung zweiter Ordnung/zweiten Grades (d.h. eine quadratische Regressionsgleichung) zur Berechnung der Endotoxinkonzentration verwendet werden.

b. Bei der Endpunktmethode wird die Standardkurve erstellt durch Auftragen der OD-Werte über den Endotoxinkonzentrationen der Standards.

3. Die Endotoxinkonzentrationen berechnen.

Die Endotoxinkonzentrationen aller Proben (einschließlich Standards und Kontrollen) anhand der folgenden Geradengleichung berechnen: $Y = aX + b$ nach Umwandlung zu $X = (Y – b) / a$

wobei:

Y = logarithmische Anlaufzeit (kinetische Methode) oder optische Dichte (Endpunktmethode)

X: Kinetische Methode: X = logarithmische Endotoxinkonzentration (zur Berechnung der Endotoxinkonzentration muss der Antilogarithmus von X bestimmt werden)
Endpunktmethode: X = Endotoxinkonzentration

a = Steigung der Geraden

b = Y-Achsenabschnitt

Die aus der Standardkurve berechnete Endotoxinkonzentration mit der Verdünnung der Probe multiplizieren, um die Konzentration der ursprünglichen, unverdünnten Probe anzugeben.

Diese Berechnungen werden üblicherweise durch die Endotoxin-Testsoftware durchgeführt.

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 dem Test beiliegende Standardkurve sollte einen Absolutwert von mindestens 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 Bereich von der niedrigsten bis zur höchsten Standard-Endotoxin-Konzentration 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 der Endotoxindotierung liegen. Vor der Bestimmung, ob die Dotierung innerhalb dieser Grenzwerte wiedergefunden wurde, die in der (undotierten) 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 undotierten 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 undotierten 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 die Dotierung 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. Förderfähigkeit der getesteten Probe begrenzt. Falls das Verfahren nicht bei einer Probenkonzentration über der niedrigsten gültigen Konzentration (ngK) validiert werden kann (1, 2), ist eine Verwendung des bakteriellen Endotoxintests mit LAL-Reagenzien anstelle des Pyrogentests nach USP nicht möglich. Die ngK berechnet sich wie folgt:

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

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

Die höchste gültige Verdünnung (hgV) ist die Probenverdünnung, die die ngK enthält (1). Sie wird berechnet, indem man die Ausgangs-Probenkonzentration durch die ngK 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 (18) 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 (beispielsweise durch Hitzebehandlung) inaktiviert werden. Gelbliche Materialien wie z.B. Tierserum, Albumin und Plasma können den chromogenen Assay auf pNA-Basis stören. Bei diesen Produkten den Assay mit Azokupplung (Associates of Cape Cod, Inc. Katalognummer CD060) verwenden. Übermäßige Trübung einer Probe kann gleichfalls den Test stören.

Erwartungswerte

Die Endotoxine in den Proben lassen sich im Bereich der Standard-Endotoxin-Konzentrationen, mit denen die Standardkurve erstellt wurde, quantitativ bestimmen. Falls zur Behebung von Hemm- oder Fördereffekten eine Verdünnung der Probe notwendig ist, erhöht sich die kleinste nachweisbare Endotoxinmenge entsprechend. Materialien biologischer Herkunft können selbst nach einer biochemischen Reinigung noch messbare Endotoxinspiegel aufweisen. Wasser, das durch Destillation, Umkehrosmose oder Ultrafiltration gewonnen wurde, kann Endotoxinspiegel unterhalb der Nachweisgrenze aufweisen, vorausgesetzt, der Purifikationsprozess 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, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
6. 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.
7. 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.
8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
13. 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.
14. 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.
15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
17. 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.
18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, 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.

Wenn Sie eine Kopie dieser Gebrauchsanleitung in Deutsch wünschen, besuchen Sie bitte die Website von ACC unter http://www.acciusa.com/lal/productinserts/pyrochrome.html

Lisato degli amebociti del *Limulus*

PYROCHROME®

Prodotto da:
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Tel.: +1 (508) 540-3444
Fax: +1 (508) 540-8680
Assistenza tecnica: +1 (800) 848-3248
Assistenza clienti: +1 (800) 525-8378

PN000856-it Rev1 Licenza U.S.A. n. 700 Gennaio 2011

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 farmacopea statunitense è il test LAL ufficiale a cui si fa riferimento in specifiche monografie USP ed è armonizzato ai capitoli equivalenti della farmacopea europea (EP) (3) e giapponese (JP) (4).

Breve descrizione del test

Il lisato degli amebociti del *Limulus* è un estratto acquoso di cellule ematiche (amebociti) del *Limulus polyphemus* o "granchio a ferro di cavallo". In presenza dell'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 para-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 (5). 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 diazocopulazione. 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 di analisi Pyrochrome® sono rapidi, specifici, semplici da eseguire e altamente sensibili. Il limite di rilevamento dipende dal metodo e dalla strumentazione usati e può raggiungere una sensibilità di 0,001 unità endotossiniche (EU) per mL.

Antecedenti e principio biologico

Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* nel 1885 (6). 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* (7). Levin e Bang determinarono successivamente che la reazione era enzimatica e che gli enzimi si trovavano nei granuli degli amebociti (8, 9). Essi dimostrarono che la coagulazione ha inizio da un unico componente strutturale della parete cellulare dei batteri, chiamato endotossina o lipopolisaccaride (10). In base alle conoscenze attuali si ritiene che la reazione consista in una cascata di passaggi di attivazione enzimatica che termina con la scissione della proteina, il coagulogeno. Il prodotto insolubile della scissione del coagulogeno (coagulina) si salda mediante interazione ionica. Se si forma una quantità sufficiente di coagulina, il prodotto diventa dapprima torbido, quindi gelifica con formazione di coagulo. Questa interazione crea le basi del dosaggio dell'endotossina chiamato test del lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL). Nel 1977, ricercatori giapponesi scoprirono che il LAL attivato da endotossine 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 (11). 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 reagente 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 dosaggio LAL, reazione chimica e applicazioni sono reperibili nella letteratura pertinente (12, 13, 14).

Reagente

Pyrochrome® viene confezionato in forma liofilizzata in fiale da 3,2 mL. Contiene un estratto acquoso di amebociti di *Limulus polyphemus*, stabilizzatore, sali, tampone e substrato cromogenico.

Pyrochrome® non viene etichettato con una sensibilità specifica. La sensibilità in un dato test (indicata con λ) è la concentrazione più bassa di endotossina utilizzata per costruire la curva standard. La sensibilità maggiore (λ) di Pyrochrome® è pari a 0,001 EU/mL in un dosaggio con il metodo cinetico e 0,005 EU/mL in un dosaggio con il metodo endpoint. 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 (15). Pertanto, usare prudenza nella manipolazione di Pyrochrome®.

Procedura di ricostituzione

1. Picchiettare leggermente la fiala di Pyrochrome® per far cadere sul fondo i residui di materiale. 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 polvere di LAL sul tappo non influisce sull'esito del test.
2. Ricostituire Pyrochrome® con 3,2 mL di tampone Pyrochrome® o Glucashield® (disponibile separatamente presso Associates of Cape Cod, Inc.). Per ottenere una sensibilità pari a 0,001 EU/mL in un lettore di micropiastre, è necessario ricostituire Pyrochrome® con Glucashield®. In un lettore di provette è possibile raggiungere questa sensibilità sia con il tampone di ricostituzione Pyrochrome® che con il tampone Glucashield®. 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) 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 di Pyrochrome® liofilizzato, evidenziato da una perdita di sensibilità e da un 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 indica contaminazione né compromette l'attività del prodotto; tuttavia, un precipitato a fiocchi o un colore marcatamente giallo indicano deterioramento e in tal caso non si deve usare il reagente. Il Pyrochrome® ricostituito è meno stabile del prodotto liofilizzato; le fiale possono essere conservate per non più di 8 ore a 2-8 °C. Tenere presente che, per raggiungere la massima sensibilità, potrebbe essere necessario l'uso di reagente appena ricostituito. 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, le sostanze estraibili da alcune materie plastiche possono interferire con il test. 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 diluizione di campione miscelato con un ugual volume di Pyrochrome®) deve essere compreso tra 6 e 8. Correggere il pH del campione con HCl, NaOH o tampone (esente da endotossina rilevabile). Diluire il componente HCl o NaOH concentrato con LRW fino a una concentrazione adeguata e usarne un volume che non comporti una significativa diluizione del campione in esame. Se al momento della correzione del pH nel campione si forma del precipitato, diluire il campione (senza tuttavia 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 del test forniti con Pyrochrome®

1. *Pyrochrome®* (vedere la descrizione riportata nelle precedenti sezioni "Reagente" e "Procedura di ricostituzione").
2. *Tampone di ricostituzione Pyrochrome®* (solo numero di catalogo C1500). Usare il tampone per la ricostituzione del Pyrochrome® come descritto in precedenza.
3. *Tampone di ricostituzione Glucashield®* (solo numero di catalogo CG1500). Usare il tampone per la ricostituzione del Pyrochrome® come descritto in precedenza.
4. *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 in relazione all'endotossina standard di riferimento (RSE) statunitense ed è specificata nel Certificato di analisi. L'endotossina standard di riferimento USP (identica alla RSE) può essere richiesta alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.

   Nota - Il Certificato di analisi e la potenza ivi riportata si riferiscono a una combinazione specifica di lotti di Pyrochrome® e di CSE. Un dato lotto di CSE può esibire potenze differenti (EU/ng) se analizzato con lotti differenti di Pyrochrome® o con Pyrotell o Pyrotell-T. Analogamente, è probabile che lotti differenti di CSE, testati con lo stesso lotto di Pyrochrome®, esibiscano potenze diverse. **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 in fiala da 10 ng come controllo di depirogenazione.
5. *Reagenti diazoici* - 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 di test 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 in relazione all'endotossina standard di riferimento (RSE) statunitense ed è specificata nel Certificato di analisi. L'endotossina standard di riferimento USP (identica alla RSE) può essere richiesta alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. **Nota** - Il Certificato di analisi e la potenza ivi riportata si riferiscono a una combinazione specifica di lotti di Pyrochrome® e di CSE. Un dato lotto di CSE potrebbe esibire potenze differenti (EU/ng) se analizzato con lotti differenti di Pyrochrome®, Pyrotell o altre marche di reagenti LAL (1). Analogamente, è probabile che lotti differenti di CSE, testati con lo stesso lotto di Pyrochrome®, esibiscano potenze diverse. **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). Le fonti consigliate includono Associates of Cape Cod, Inc. (sono disponibili varie misure e configurazioni di confezionamento). 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®*. Disponibile presso Associates of Cape Cod, Inc. (numero di catalogo GB051), può essere usato al posto del tampone di ricostituzione Pyrochrome® per eliminare l'interferenza ad opera dei (1→3)-β-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 diazocopulazione). 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 di diazocopulazione.

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. Controllare le micropiastre prima dell'uso e gettarle se presentano graffi o altre interferenze ottiche sulla superficie o sul fondo dei pozzetti.
2. *Provette di reazione*. I dosaggi cinetici possono essere eseguiti in un lettore di provette per incubazione, come il Pyros Kinetix® Flex, usando provette di coltura da 8 x 75 mm in vetro borosilicato depirogenate (Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo TK100). Anche i dosaggi del metodo endpoint possono essere analizzati in provette di coltura in vetro borosilicato depirogenate, da 8 x 75 mm o 10 x 75 mm (Associates of Cape Cod, Inc., numeri di catalogo TK100 e TB050, rispettivamente).
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, usare un lettore di micropiastre con capacità di incubazione, come i modelli BioTek® ELx808™ o Molecular Devices VersaMax™, oppure un lettore di provette, come il Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc., numeri di catalogo PKF32, PKF64 e PKF96).

   Per il metodo endpoint, usare un apposito lettore per leggere le micropiastre, oppure, se si esegue il test 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 micropiastre (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. *Rastrelliere portaprovette* per l'inserimento e/o l'incubazione delle provette di diluizione e di reazione.
6. *Pipette*, micropipette con puntali (i pipettatori multicanale sono utili quando si usano le micropiastre) 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. 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, 16, 17).

Controlli

I controlli sono necessari per garantire la validità del test. Le procedure consigliate sono definite in dettaglio dalla FDA (1), USP (2), EP (3) e JP (4).

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 contrassegnata con il simbolo λ. (**Nota:** Nei test con Pyrochrome® con i metodi endpoint e cinetico sono possibili limiti di rilevamento, rispettivamente, di 0,005 e 0,001 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 consigliati e disponibili per 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. Un valore di 0,5 EU/mL è adeguato 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". Il controllo positivo deve essere preparato in acqua allo stesso modo dei controlli positivi del prodotto.

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. Prestare attenzione a evitare la contaminazione durante la preparazione del test. Le apparecchiature devono essere adeguatamente calibrate e qualificate per garantire temperature di incubazione uniformi.

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. Aggiungere al contenitore di reazione il volume adeguato di campione (controllo negativo, standard di endotossina, campione o controllo positivo del prodotto) per ottenere un rapporto adeguato quando si aggiunge Pyrochrome® (vedere il punto 3. qui sotto).

   Per i test effettuati in un lettore di micropiastre, usare un rapporto lisato-campione pari a 1:1. Per prestazioni ottimali, usare un volume di 0,05 mL per ciascun metodo (cinetico, endpoint o diazocopulazione). In alternativa, è possibile usare 0,1 mL per i metodi cinetico ed endpoint; tuttavia, per conseguire la massima sensibilità o una curva standard ad ampio range (maggiore di 3 logaritmi), si consigliano 0,05 mL.

   Per i test effettuati in un lettore di provette Pyros Kinetix® Flex, è consentito usare un rapporto lisato-campione pari a 1:1 oppure 1:4. Per i test eseguiti con reagente LAL Pyrochrome® e campione in rapporto 1:1, è necessario un volume di campione di 0,1 mL. Per i test nel lettore di provette Pyros Kinetix® Flex con reagente LAL Pyrochrome® e campione in rapporto 1:4, il volume del campione deve essere di 0,2 mL.
3. Aggiungere Pyrochrome® a seconda del metodo adottato e miscelare. Una miscelazione non adeguata è spesso causa di risultati insoddisfacenti dell'analisi. La maggior parte dei lettori di piastre include una funzione di agitazione.
   a. Per una micropiastra, usare un rapporto lisato-campione di 1:1 e aggiungere un volume di Pyrochrome® uguale al volume del campione (vedere il punto 2. qui sopra; generalmente si tratta di 0,05 mL). Aggiungere Pyrochrome® quanto più rapidamente possibile in tutti i campioni e miscelarlo per 5-30 secondi. Collocare la piastra su un supporto dell'incubatore (per un test endpoint) o in un lettore di micropiastre con capacità di incubazione (per un test cinetico).
   b. Per i metodi che si avvalgono di provette di reazione o cuvette, il volume di Pyrochrome® aggiunto può essere uguale al volume del campione (0,1 mL in un lettore di provette Pyros Kinetix® Flex) oppure un quarto di esso (0,05 mL in un lettore di provette Pyros Kinetix® Flex). Importante - Il tempo di reazione deve essere lo stesso per tutte le provette. Nel caso del lettore di provette Pyros Kinetix® Flex, lo strumento rileva la provetta di reazione all'inserimento e inizia la temporizzazione. In ogni contenitore di reazione in sequenza aggiungere Pyrochrome®, miscelare per circa 2 secondi e sistemare il contenitore nel dispositivo di incubazione (per i test endpoint) o nel lettore di provette (per i test cinetici).

   Indipendentemente dal fatto che si usino micropiastre o provette di reazione, è utile aggiungere Pyrochrome® con un pipettatore a ripetizione.

   Prestare attenzione a evitare la contaminazione della fiala di Pyrochrome® durante la manipolazione del reagente.
4. Leggere il test.
   a. Per il metodo cinetico, lasciare proseguire il test fino ad aver incubato tutti i campioni per un periodo di tempo considerevolmente più lungo di quello necessario affinché la concentrazione più bassa di endotossina standard raggiunga la densità ottica di inizio di 405 nm. 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 aggiungendo 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 un lettore di micropiastre (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 ed è probabile che presenti variazioni 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 con diazocopulazione, estrarre dall'incubatore le provette di reazione o la piastra e arrestare la reazione aggiungendo 0,05 mL di soluzione 1 (nitrito di sodio ricostituito con HCl). Agitare la piastra per miscelare. Usando un nuovo puntale di pipetta, aggiungere 0,05 mL di soluzione 2 (solfammato di ammonio) in ciascun pozzetto di reazione e miscelare. Infine, usando un altro puntale nuovo, aggiungere 0,05 mL di soluzione 3 (NEDA) in ciascun pozzetto e miscelare. 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 ed è probabile che presenti variazioni 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 micropiastre 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.

   Considerato che il valore assoluto del coefficiente di correlazione per la curva standard è almeno 0,980 (vedere il punto 2. della sezione "Interpretazione", più avanti), per calcolare le concentrazioni di endotossina è possibile usare un'equazione della retta di regressione polinomiale di secondo grado (ossia, quadratica).

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 standard e controlli) basandosi sull'equazione di una linea retta Y = aX + b riformulata come X = (Y – b) / a

dove:

Y = metodo cinetico: logaritmo del tempo di inizio; metodo endpoint: densità ottica

X: Metodo cinetico: X = logaritmo della concentrazione di endotossina (per ottenere la concentrazione di endotossina è necessario determinare l'antilogaritmo di X)

Metodo endpoint: X = concentrazione di endotossina

a = pendenza della linea

b = intercetta sull'asse Y

Per esprimere la concentrazione in termini di campione originale non diluito, moltiplicare la concentrazione di endotossina calcolata in base alla linea standard per la diluizione del campione.

Normalmente, questi calcoli sono effettuati da software di analisi delle endotossine.

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 per la curva standard incluso nel test deve avere un valore assoluto di almeno 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 interferenze significative, la concentrazione misurata di endotossina in un controllo positivo del prodotto di 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 di campione superiore alla minima concentrazione valida (MVC), non è possibile usare il test delle endotossine batteriche mediante reagente LAL al posto del test dei pirogeni della USP. La MVC è calcolata come segue:

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

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

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

Il limite di tolleranza endotossinica è di 0,2 EU/kg per i farmaci somministrati per via intratecale e di 5 EU/kg per tutti quelli somministrati per via parenterale. Il limite per i dispositivi medici è espresso per mL di un volume di estrazione o di risciacquo ottenuto nel modo descritto nella USP (18) 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 (es. 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, usare il dosaggio di diazocopulazione (Associates of Cape Cod, Inc., numero di catalogo CD060). Anche la presenza di torbidità eccessiva in un campione può interferire con il test.

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, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
6. 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.
7. 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.
8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
13. 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.
14. 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.
15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
17. 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.
18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, 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 quesito 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.

Per ottenere una copia di queste Istruzioni per l'uso in italiano, visitare il sito di ACC a http://www.acciusa.com/lal/productinserts/pyrochrome.html

Lisado de amebocitos de *Limulus*

PYROCHROME®

Fabricado por:
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
Teléfono: +1 (508) 540-3444
Fax: +1 (508) 540-8680
Asistencia Técnica: +1 (800) 848-3248
Servicio de Atención al Cliente: +1 (800) 525-8378

PN000856-es Rev1 Licencia estadounidense n.º 700 Enero de 2011

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, y está homologada con los capítulos equivalentes de la Farmacopea Europea (EP) (3) y la Farmacopea Japonesa (JP) (4).

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 para-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 (5). 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)-etilendiamina (NEDA) para obtener un derivado diazoado magenta que absorbe a un intervalo de 540-550 nm.

Los métodos de análisis 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 0,001 unidades de endotoxinas (UE) por mL.

Historia y principio biológico

Howell describió la coagulación de la sangre de *Limulus* en 1885 (6). 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* (7). Posteriormente, Levin y Bang determinaron que la reacción es enzimática y que las enzimas se encuentran en gránulos de los amebocitos (8, 9). Dichos autores demostraron que la coagulación la inicia un componente estructural exclusivo de la pared celular bacteriana, denominado endotoxina o lipopolisacárido (10). Actualmente se sabe que la reacción consiste en una cascada de pasos de activación enzimática que terminan con la escisión de la proteína, que es coagulógena. 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 denomi-nado 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 paranitroanilida (11). 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 reactivo de LAL cromogénico se forma un color, en vez de turbidez o un coágulo de gel. En todas las versiones del análisis de LAL (de 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 (12, 13, 14).

Reactivo

El Pyrochrome® se suministra en forma liofilizada, envasado en frascos de 3,2 mL. Contiene un extracto acuoso de amebocitos de *Limulus polyphemus*, estabilizante, sales, tampón y sustrato cromogénico.

El Pyrochrome® no tiene una sensibilidad específica asignada. La sensibilidad en un análisis dado (denominada λ) es la concentración de endotoxinas más baja utilizada para elaborar la curva estándar. La sensibilidad máxima, λ, del Pyrochrome® es de 0,001 UE/mL en análisis cinéticos y de 0,005 UE/mL en análisis de criterio de valoración. 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 (15), 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 material 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 polvo de LAL remanente en el tapón no afectará a la prueba.
2. Reconstituya el Pyrochrome® con 3,2 mL de tampón de Pyrochrome® o Glucashield® (que puede adquirirse por separado a Associates of Cape Cod, Inc.). Para obtener una sensibilidad de 0,001 UE/mL en un lector de microplacas, es necesario reconstituir el Pyrochrome® con Glucashield®. Esta sensibilidad puede lograrse bien con el tampón de reconstitución de Pyrochrome® o con tampón Glucashield® en un lector de tubos. 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 (entre 2 y 8 °C) 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 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 amarilleo 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 indican deterioro, por lo que el reactivo no deberá utilizarse. El Pyrochrome® reconstituido es menos estable que el producto liofilizado; los frascos pueden mantenerse hasta 8 horas entre 2 y 8 °C. Tenga en cuenta que puede ser necesario utilizar reactivo recién reconstituido para obtener la sensibilidad máxima. 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. 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 hasta obtener una concentración adecuada y utilice un volumen que no produzca 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 de Pyrochrome®* (número de catálogo C1500 solamente). Utilice el tampón para reconstituir el Pyrochrome® de la forma descrita más arriba.
3. *Tampón de reconstitución Glucashield®* (número de catálogo CG1500 solamente). Utilice el tampón para reconstituir el Pyrochrome® de la forma descrita más arriba.
4. *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 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 (10 ng/frasco) como control de despirogenación.
5. *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 se especifica 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 reactivo 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 son 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)-β-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 asegurar la ausencia de contaminación por endotoxinas o glucanos, y no deben producir inhibición ni potenciación. Compruebe las microplacas antes de utilizarlas y deséchelas si se observan arañazos o interferencias ópticas en la base o en el fondo de los pocillos.
2. *Tubos de reacción*. Los análisis cinéticos pueden realizarse en un lector de tubos con función de incubación, como el Pyros Kinetix® Flex, utilizando tubos de cultivo de vidrio de borosilicato despirogenados de 8 x 75 mm (Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo TK100). Los análisis de criterio de valoración también pueden realizarse en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato despirogenados de 8 x 75 mm o 10 x 75 mm (Associates of Cape Cod, Inc., números de catálogo TK100 y TB050, respectivamente).
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 de microplacas con función de incubación, como el BioTek® ELx808™ o el Molecular Devices VersaMax™, o un lector de tubos como el Pyros Kinetix® Flex (Associates of Cape Cod, Inc., números de catálogo PKF32, PKF64 y PKF96).

   Para el método de criterio de valoración, utilice un lector de microplacas 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 (las pipetas multicanal son útiles cuando se emplean microplacas) o pipetas de repetición con cilindros 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 ausencia 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, 16, 17).

Controles

Los controles son necesarios para garantizar la validez de las pruebas. Los procedimientos recomendados han sido detallados por la FDA (1), la USP (2), la EP (3) y la JP (4).

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:** Pyrochrome® permite alcanzar límites de detección de 0,005 y 0,001 UE/mL en pruebas de criterio de valoración y cinéticas, respectivamente). 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. Como guía, consulte los tiempos de incubación recomendados disponibles para 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 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 (Routine Testing of Drugs by the LAL Test) de las pautas de la FDA (1). El control positivo debe prepararse en agua de la misma manera que el control positivo del producto (PPC).

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. Al preparar la prueba debe tenerse cuidado para evitar la contaminación. El equipo debe estar calibrado y cualificado adecuadamente para asegurar que las temperaturas de incubación sean uniformes.

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 adecuada al añadir el Pyrochrome® (consulte el punto 3, incluido más abajo).

   Pruebas realizadas en un lector de microplacas: se utiliza una proporción 1:1 de lisado y muestra. Para conseguir una eficacia óptima, utilice un volumen de 0,05 mL de muestra para dichos métodos (cinético, de criterio de valoración o de diazoacoplamiento). Para los métodos cinéticos y de criterio de valoración también puede utilizarse 0,1 mL, aunque se recomienda utilizar 0,05 mL para conseguir la sensibilidad máxima o para obtener una curva estándar de un intervalo amplio (intervalo de más de tres logaritmos).

   Pruebas realizadas en el lector de tubos Pyros Kinetix® Flex: puede utilizarse una proporción 1:1 o 1:4 de lisado y muestra. Las pruebas realizadas con una proporción 1:1 de reactivo de LAL Pyrochrome® y muestra requieren un volumen de muestra de 0,1 mL. En las pruebas realizadas en el lector de tubos Pyros Kinetix® Flex en las que se utilice una proporción 1:4 de reactivo de LAL Pyrochrome® y muestra, el volumen de muestra deberá ser de 0,2 mL.
3. Añada la cantidad de Pyrochrome® adecuada para el método y mezcle. La mezcla incorrecta es una causa frecuente de análisis insatisfactorios. La mayoría de los lectores de placas tienen una función de agitación.
   a. Para las microplacas se utiliza una proporción 1:1 de lisado y muestra, y el volumen de Pyrochrome® añadido es igual al volumen de muestra (consulte el punto 2 anterior; por lo general 0,05 mL). 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 (para las pruebas de criterio de valoración) o en el interior de un lector de microplacas con función de incubación (para las pruebas cinéticas).
   b. Para los métodos que emplean tubos o cubetas de reacción individuales, el volumen de Pyrochrome® añadido puede ser bien igual al volumen de muestra (0,1 mL en un lector de tubos Pyros Kinetix® Flex) o bien un cuarto del volumen de muestra (0,05 mL en un lector de tubos Pyros Kinetix® Flex). Importante: el tiempo de reacción debe ser el mismo para todos los tubos. En el caso del lector de tubos Pyros Kinetix®, el instrumento detecta el tubo de reacción al introducirlo y empieza a cronometrar. Haga lo siguiente en cada recipiente de reacción: añada Pyrochrome®, mezcle durante unos 2 segundos y coloque el recipiente en el dispositivo de incubación (al realizar pruebas de criterio de valoración) o en el lector de tubos (al realizar pruebas cinéticas).

   Independientemente de que se utilicen microplacas o tubos de reacción, es conveniente utilizar una pipeta de repetición para añadir el Pyrochrome®.

   Debe tenerse cuidado para evitar contaminar el frasco de Pyrochrome® al manipular el reactivo.
4. Obtenga una lectura de la prueba.
   a. Si 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 DO405 de activación. Los sistemas automatizados de análisis suelen dar por terminada la prueba después de un periodo de tiempo preestablecido. Solicite 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 añadiendo 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 microplacas (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 de reacción o la placa de la incubadora y detenga la reacción añadiendo 0,05 mL de la solución 1 (nitrito de sodio reconstituido con HCl). Agite la placa para mezclar. Empleando una punta de pipeta nueva, añada 0,05 mL de la solución 2 (sulfamato de amonio) a cada pocillo de reacción y mezcle. Finalmente, añada 0,05 mL de la solución 3 (NEDA) a cada pocillo con una punta de pipeta nueva y mezcle. 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 microplacas 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.

   Si el valor absoluto del coeficiente de correlación de la curva estándar es de 0,980 como mínimo (consulte el punto 2 del apartado «Interpretación», incluido más abajo), puede utilizarse una ecuación polinómica de segundo grado (esto es, cuadrática) de línea de regresión para calcular las concentraciones de endotoxinas.

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 recta Y = aX + b reordenada como X = (Y – b) / a

donde:

Y = logaritmo del tiempo de activación (método cinético) o densidad óptica (método de criterio de valoración)

X: Método cinético: X = logaritmo de la concentración de endotoxinas (es necesario determinar el antilogaritmo de X para obtener la concentración de endotoxinas)

Método de criterio de valoración: X = concentración de endotoxinas

a = pendiente de la recta

b = ordenada en el origen

Multiplique la concentración de endotoxinas calculada a partir de la línea estándar por la dilución de la muestra para expresar la concentración en términos de la muestra original sin diluir.

Estos cálculos suelen realizarse mediante software de análisis de endotoxinas.

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 significativa-mente 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 de 0,980 como mínimo.
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 muestra superior a la concentración mínima válida (CMV), entonces la prueba de endotoxinas bacterianas que utiliza reactivo de 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 productos administrados por vía parenteral. 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 (18) 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 (p. ej., 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 análisis de diazoacoplamiento (Associates of Cape Cod, Inc., número de catálogo CD060). El exceso de turbidez de una muestra también puede interferir en la prueba.

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, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
6. 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.
7. 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.
8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
13. 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.
14. 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.
15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
17. 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.
18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, 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.

Para obtener una copia de estos manuales de instrucciones (MDI) en español, remítase al sitio web de ACC en http://www.acciusa.com/lal/productinserts/pyrochrome.html

Limulus Amebocyte Lysate

PYROCHROME®

製造業者：
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA
電話： +1 (508) 540-3444
ファックス： +1 (508) 540-8680
テクニカルサービス： +1 (800) 848-3248
カスタマーサービス： +1 (800) 525-8378

PN000856-ja Rev1 米国ライセンス番号700 2011年1月

カブトガニ血球抽出成分
PYROCHROME®

グラム陰性細菌エンドトキシン（リポ多糖）の検出と定量用

カブトガニ血球抽出成分（LAL）試験を米国食品医薬品局（FDA）ガイドライン（1）に準拠して実施すると、「ヒト用注射剤（生物学的製剤を含む）、動物用注射剤、医療機器」の最終製品試験である米国薬局方（USP）発熱性物質試験（ウサギ発熱性試験）の代用となります。LAL 試験は、これらの製造に用いる水等の原材料中のエンドトキシンの定量や製造工程におけるエンドトキシン値のモニタリングに推奨されています。USP 細菌エンドトキシン試験法（2）は、特定の USP モノグラフ類に参考として引用されている公式の LAL 試験法であると共に、欧州薬局方（EP）及び日本薬局方（JP）の当該試験法（3, 4）とも調和されています。

試験の概要

カブトガニ血球抽出成分は、カブトガニである *Limulus polyphemus* の血球（amebocyte）の水溶性抽出物です。エンドトキシンの存在下で、LAL 中の複数の凝固因子がタンパク質分解カスケードにより活性化され、Pyrochrome® LAL 中に存在する無色の合成ペプチド基質を分解します。この反応により、黄色を呈し 405 nm に吸収を持つパラ - ニトロアニリン（*p*NA）が遊離します。Pyrochrome® を等量の検体に加え、反応混液を37℃で加温することで LAL 試験を行います。検体中のエンドトキシン濃度が高いほど、*p*NA は速く産生されます。Pyrochrome® では、エンドトキシンを2つの方法で定量することができます（5）。カイネティック法では、405 nm で特定の吸光度に達するまでの時間（onset time）を測定します。エンドトキシンの濃度が高いほど、onset time は短くなります。この測定には、制御された温度（通常37℃）で多数の検体を加温し、一定の間隔で吸光度を測定するための装置が必要となります。onset time の対数をエンドトキシン標準品の濃度の対数に対してプロットして検量線を作成し、この検量線を検体中のエンドトキシンの濃度を算出するために使用します。一方、エンドポイント - 比色法においては、一定の時間加温した後、遊離した *p*NA の量を測定します。測定した吸光度を既知のエンドトキシン標準品の濃度に対してプロットした検量線を用いて、検体中のエンドトキシン濃度を算出します。405 ～ 410 nm に吸収を持つ試料にはジアゾカップリング反応が利用できます。この方法では、*p*NA（エンドポイント - 比色法で形成されます）が、塩酸中で亜硝酸塩と、次いで N-(1- ナフチル)- エチレンジアミン（NEDA）と反応し、540 ～ 550 nm に吸収を持つ赤紫色のアゾ色素を形成します。

Pyrochrome® による試験法は、迅速で特異性が高く、簡便に行える上に高感度です。検出限度は使用方法と使用装置類によって違いがありますが、最高感度は 1 mL 当たり 0.001 エンドトキシンユニット（EU）となります。

経緯と生物学的原理

Howell がカブトガニの血液凝固について報告したのは 1885 年のことでした（6）。1950 年代、米国マサチューセッツ州ウッズホールにある Marine Biological Laboratory で、Bang はグラム陰性細菌がカブトガニの血液を凝固させることを発見しました（7）。Levin と Bang は後に、この反応は酵素反応によるもので、これらの酵素は、血球細胞中の顆粒に局在していることを明らかにしました（8, 9）。両氏はさらに、エンドトキシンもしくはリポ多糖と呼ばれる細菌細胞壁に特徴的な構成成分により凝固が開始されることを明らかにしました（10）。現在では、この反応は段階的な酵素活性化反応のカスケードから成り、coagulogen と呼ばれるタンパク質の切断で反応が終了すると考えられています。coagulogen の切断産物（coagulin）は不溶性であり、イオン性相互作用により重合します。十分な量の coagulin が形成されると混濁が見られ、その後にゲル化が起こります。この相互作用がカブトガニ血球抽出成分（LAL）試験と呼ばれるエンドトキシン測定の基本となっています。1977 年、日本人研究者らにより、エンドトキシンで活性化された LAL は、coagulogen に類似したアミノ酸切断部位と発色団であるパラニトロアニリドを有する小さな発色性ペプチドも切断することが見出されました（11）。この切断により黄色を呈し 405 nm で光を吸収する *p*NA が遊離します。LAL 試験にこの発色を取り入れる中で、LAL に発色性基質を加える際、coagulogen 濃度を下げ、反応干渉を最小限に抑えています。従って、エンドトキシンを発色性 LAL 試薬に加えると、濁度やゲル化より先に発色が見られます。LAL 試験の全種類（ゲル化、比濁法、比色法）において、存在するエンドトキシンの量が増加すると、エンドポイント（ゲル化、濁度、色）の発現が速くなります。LAL 試験の種類、反応、適用に関するさらに詳しい情報は文献中から入手することができます（12, 13, 14）。

試薬

Pyrochrome® は（3.2 mL 用）バイアルに凍結乾燥状態で充填されています。Pyrochrome® には *Limulus polyphemus* の水溶性血球抽出物、安定化剤、塩類、緩衝液、発色基質が含まれています。

Pyrochrome® には特定の感度の表示はありません。ある試験の感度（λ と表記）は、検量線を作成するために用いたエンドトキシンの最低濃度になります。Pyrochrome® の最高感度 λ は、カイネティック測定法では 0.001 EU/mL、エンドポイント測定法では 0.005 EU/mL です。Pyrochrome® は *in vitro* での検査のみに使用してください。ヒトのエンドトキシン血症の診断用には使用できません。Pyrochrome® の毒性は測定されていません。しかし、LAL が長時間もしくは繰り返し皮膚に触れると、I 型アレルギー反応を起こすことがあります（15）。従って Pyrochrome® の取扱いには注意が必要です。

調製手順：

1. Pyrochrome® のバイアルを軽く叩いて、飛散した粉末を底に落とします。灰色の栓を持ち上げ、真空状態を解除します。バイアルの口の部分を汚染しないようにしてください。栓をはずし、廃棄します。ゴム栓に針を刺しての注入やゴム栓の再使用は避けてください。LAL の粉末が少量、栓に残っても、試験には影響がありません。
2. Pyrochrome® を 3.2 mL の Pyrochrome® 緩衝液もしくは Glucashield® 緩衝液（Associates of Cape Cod. Inc. から別売）を添加して溶解します。マイクロプレートリーダーで測定する際に、0.001 EU/mL の感度を得るためには、Glucashield® を用いて Pyrochrome® を調製する必要があります。チューブリーダー（試験管用吸光度計）で測定する際には、Pyrochrome® 調製用緩衝液もしくは Glucashield® 緩衝液どちらを使用してもこの感度を得ることができます。凍結乾燥粉末（ペレット）が溶けるまでに数分かかるので、使用前に少なくとも 5 分間は放置してください。液が均一になるようにバイアルを振り混ぜます。しかし、泡立てると感度が下がる原因となることがありますので、激しい撹拌は避けてください。使用しない時はバイアルを Parafilm M® で被い、冷所（2 ～ 8℃）で保存します。Pyrochrome® は調製後 8 時間以内に使用してください。

保存条件

凍結乾燥した Pyrochrome® は比較的安定で、適切に保存された場合、ラベルに表示された有効期限までは活性が完全に保持されます。2 ～ 8℃で本製品を保存してください。温度が 37℃を超えると凍結乾燥した Pyrochrome® が急速に劣化し、感度が下がり、製品に明らかな黄変が認められるようになります。温度が上がらないように、Pyrochrome® は断熱容器に入れて発送されます。溶解前の Pyrochrome® は光に不安定ですので、暗所で保存してください。

Pyrochrome® の溶解液は通常、透明でやや乳白色を呈しています。ロットによっては、均一な濁りがわずかに見られることがあります。微細な線維や糸状の物質があっても、汚染ではなく活性に影響はありませんが、羊毛状の塊が見られたり、黄色に変色した場合は劣化の現れですので、その試薬は使用しないでください。調製した Pyrochrome® は凍結乾燥品に比べ不安定です。調製後のバイアルの保存時間は 2 ～ 8℃ 8 時間以内となります。最高の感度を得るためには調製直後の試薬を用いることが必要になることもあります。溶解後の Pyrochrome® は凍結できません。

検体の採取と調製

検体はエンドトキシンフリーの容器に無菌的に採取します。容器表面へのエンドトキシンの吸着を最小限度に抑えるために、再利用し、脱パイロジェン処理したガラス製品や使い捨てポリスチレンまたはポリエチレンテレフタレート（PET）製プラスチック製品をお勧めします。プラスチック製の容器の中には、エンドトキシンが検出されるものがあります。また、プラスチック製品の中には、製品から抽出される物質が試験を妨害するものもあります。器具が試験に使用できるかどうかを調べる必要があり、これには器具類の中から無作為に容器を選び、少量の LAL 試薬用水（LRW）を使い室温で一時間洗浄し、その洗浄液を検体として試験を行います。洗浄液に含まれるエンドトキシンの量は使用されるエンドトキシン標準品の最低濃度より有意に低くなければなりません。また、既知量のエンドトキシンを加え、その回収量を測定し、洗浄液が試験を阻害または促進することがないことを確認する必要があります。反応混液（検体または検体の希釈液を等量の Pyrochrome® と混ぜたもの）の pH は 6 ～ 8 でなければなりません。検体の pH を HCl、NaOH、または緩衝液（エンドトキシンが検出されない）で調整します。濃い HCl や NaOH を LRW で適切な濃度に希釈し、試験検体を著しく希釈しない程度の量を pH 調整に使用します。pH 調整の途中で試料中に沈殿物が形成された場合は、pH を調整する前に試料を希釈します（MVD を超えないようにしてください「試験の制限」参照）。緩衝作用のない生理食塩水や水の pH を調整しようとしないでください。希釈するだけで pH に関する問題が解決することがある事に留意してください。

タンパク質を変性させる物質、イオンをキレートする物質、エンドトキシンを結合する物質、エンドトキシンの疎水性を変化させる物質は、試験を妨害する可能性があります。妨害物質の検出には、既知量のエンドトキシン標準品を検体に加え、回収されるエンドトキシンの量が有意に増加または、減少しているかを調べます（「試験の制限」の項参照）。大半の場合、検体を希釈すると、妨害物質の濃度や活性が減少し、有効な試験結果を得ることができます。適切なコントロール（試験対照）や希釈方法は「試験手順」に説明されています。検体採取後、試験は出来るだけ早く行ってください。試験前に無菌ではない検体を保存または発送する場合は、検体を凍結することをお勧めします。検体中に含まれるエンドトキシンの濃度が低いことが予想される場合には、保存中のエンドトキシンの低下を調べる必要があります。

試験手順

Pyrochrome® のセットに含まれている試験試薬

1. *Pyrochrome®*（上記の「試薬」と「調製手順」参照）。
2. *Pyrochrome® 溶解用緩衝液*（カタログ番号 C1500 に添付）。上述したように Pyrochrome® の溶解にこの緩衝液を使用します。
3. *Glucashield® 溶解用緩衝液*（カタログ番号 CG1500 に添付）。上述したように Pyrochrome® の溶解にこの緩衝液を使用します。
4. *対照エンドトキシン標準品*（CSE）－ジアゾキット（CD060）にのみ添付：各バイアルには CSE が 10 ng 含まれています。CSE は試験成績書（C of A。CSE の力価が記載されています）に明示されている量を用いて調製します。CSE は素早く溶けるように特別な処方で作られています。LRW を加えた後、バイアルを 30 ～ 60 秒間ボルテックスミキサーで撹拌します。その後 CSE を使用することができます。すぐに使用しない場合は、使用前に 30 秒間バイアルをボルテックスミキサーで撹拌してください。その後、適切に希釈し、必要なエンドトキシン濃度にしてください。希釈前後にボルテックスミキサーで撹拌してください。調製した CSE は 2 ～ 8℃で保存した場合、7 日間安定です。調製した CSE は凍結しないでください。

   CSE の各バイアルには U.S. 参照エンドトキシン標準品（RSE）に対して活性を測定したエンドトキシンが含まれており、試験成績書に表示されています。USP エンドトキシン標準品（RSE と同等品）は U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. から入手できます。

   注意：試験成績書とそこに記載されている力価は Pyrochrome® と CSE のロットの組み合わせに特有のものです。CSE のあるロットで、違うロットの Pyrochrome® や Pyrotell もしくは Pyrotell-T を使用して試験を行った場合、力価（EU/ng）が異なることがあります。同様に、同じロットの Pyrochrome® で試験を行った場合でも、CSE のロットが違うと力価が異なることがあります。**正しい試験成績書と力価を使用するようにしてください。**

   検量線の作成に用いるエンドトキシン標準品の各濃度を調製する場合や陽性コントロール及び陽性製品（妨害）コントロールに CSE を使用します。この 10 ng/ バイアルの CSE を脱パイロジェンのコントロールとして使用しないでください。
5. *ジアゾ試薬* - ジアゾキット（CD060）にのみ添付：バイアル 1a　HCl、バイアル 1　亜硝酸ナトリウム、バイアル 2　スルファミン酸アンモニウム、バイアル 3　NEDA。バイアル 1 をバイアル 1a の全量、バイアル 2 を水 4 mL、バイアル 3 を水 4 mL を使用して調製します。必要な水のグレードは下記の第 5 項を参照してください。

Pyrochrome® 別売試薬

1. *エンドトキシン標準品*（CSE）。（Associates of Cape Cod, Inc.、カタログ番号 EC010。）CSE を試験成績書（CSE の力価が記載されている）に明記された量を用いて添付文書の指示に従って調製します。添付文書の指示に従ってエンドトキシン標準品を使用、保存します。CSE の力価は U.S. 参照エンドトキシン標準品（RSE）に対して測定されており、試験成績書に表示されています。USP エンドトキシン標準品（RSE と同等品）は U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. から入手できます。**注意：**試験成績書とそこに記載されている力価は Pyrochrome® と CSE のロットの組み合わせに特有のものです。CSE のあるロットでは、違うロットの Pyrochrome® や Pyrotell もしくは他ブランドの LAL 試薬を使用して試験を行った場合、力価（EU/ng）が異なることがあります（1）。同様に、同じロットの Pyrochrome® で試験を行った場合でも、CSE のロットが違うと力価が異なることがあります。**正しい試験成績書と力価を使用するようにしてください。**

   検量線を作成するためにエンドトキシン標準品を希釈する場合や陽性コントロール及び陽性製品（妨害）コントロールに CSE を使用します。
2. *LAL 試薬用水*（LRW）。LRW の購入には Associates of Cape Cod, Inc. をお勧めします（様々な大きさと梱包形態が利用可能です）。LRW として使用が可能であることが確かめられれば、市販の静菌剤フリーの USP 注射用水（滅菌 WFI）もしくは USP 灌流水を使用することができます。USP 滅菌 WFI のエンドトキシン限度値は 0.25 EU/mL であるため、USP 滅菌 WFI 中にエンドトキシンが検出され、使用には適さない可能性があります。

   水が LRW として使用できることを確かめるために、水を検体として陽性製品コントロールとともに試験を行います（「コントロール（試験対照）」に関するセクションの 1.c 項参照）。試験済み LRW を標準品の希釈や陽性コントロールの調整に使用します（「コントロール」の 1.a 項と 1.b 項参照）。標準品の onset time やエンドポイント測定により検量線を作成します。相関係数は 0.980（絶対値）以上でなければなりません。試験を行う水のエンドトキシン濃度は、エンドトキシンの最低濃度より以下の範囲に検量線を外挿して算出し、標準品の最低濃度より有意に低くなければなりません。また、陽性製品コントロールのエンドトキシン濃度は、陽性コントロールのエンドトキシン濃度 ± 25% の範囲内でなければなりません。
3. *Glucashield® 緩衝液*。Glucashield® 緩衝液は、Associates of Cape Cod, Inc.（カタログ番号 GB051）より入手可能で、(1 → 3)- β -D- グルカンによる妨害を排除するため、Pyrochrome® 調製用緩衝液の代わりに使用することができます。
4. *50% 酢酸*（エンドポイント法用）。氷酢酸を等量の蒸留水または逆浸透（RO）水に加えて調製します。（LRW（上記 2 参照）を使用できますが、その必要は有りません。）
5. *水*（ジアゾカップリング試薬の調製用のみ）。蒸留水（LRW を含む）、脱イオン水、逆浸透水など実験用の水が使用可能です。この水は不使用はジアゾカップリング反応に限られているので、エンドトキシンフリーである必要はありません。

器具と装置

1. *マイクロプレート*。96 穴、蓋つきマイクロプレート（Associates of Cape Cod, Inc. より入手可能、カタログ番号 CA961）。プレートはエンドトキシンやグルカンの混入に関する保証もしくは試験を受けている必要があり、反応阻害や促進の原因となってはなりません。使用前にマイクロプレートを調べ、ウェルの底の表面や中に傷や他の光学上の妨害となるものがあった場合は廃棄してください。
2. *反応用チューブ*。カイネティック法は、8×75 mm の脱パイロジェン処理済みホウケイ酸ガラス培養管（Associates of Cape Cod, Inc.、カタログ番号 TK100）を用いて Pyros Kinetix® Flex のような加温チューブリーダーを用いて実施することができます。エンドポイント法も 8×75 mm もしくは 10×75 mm の脱パイロジェン処理済みホウケイ酸ガラス培養管（Associates of Cape Cod, Inc.、カタログ番号はそれぞれ TK100 と TB050）を用いて実施することができます。
3. 405 nm もしくはジアゾ化法用には 540 ～ 550 nm で測定出来る*光学リーダー*。カイネティック法には BioTek® ELx808™ もしくは Molecular Devices VersaMax™のような温度制御機能付きマイクロプレートリーダー、または Pyros Kinetix® Flex チューブリーダー（Associates of Cape Cod, Inc.、カタログ番号 PKF32、PKF64、PKF96）のようなチューブリーダーを使用してください。

   エンドポイント法には、マイクロプレートで測定を行うためのマイクロプレートリーダーを使用し、試験を反応用チューブで行う場合には適切なキュベットを用いて分光光度計を使用してください。
4. 37±1℃を維持できる*インキュベーター*（エンドポイント法にのみ必要）。マイクロプレート（もしくは適切な場合は反応用チューブ）用にはドライブロックインキュベーターをお勧めします。（エンドポイント法で反応用チューブを用いる場合はウォーターバスも使用できます。）インキュベーターは温度が均一に分布していなければなりません。
5. 希釈液や反応用チューブを立てて、加温するための*試験管立て*。
6. *ピペット*、ピペットチップのついたマイクロピペット（マイクロプレートを使用する場合はマルチチャンネルピペッターが便利です）、またはプラスチック製注射筒がついた連続ピペッター。妨害するエンドトキシンやグルカンがない使い捨てピペットやチップをお勧めします。Associates of Cape Cod, Inc. から妨害するエンドトキシンやグルカンがないことを保証した Pyroclear® 製品が販売されています。
7. *ボルテックスミキサー*
8. *Parafilm M®*（American National Can™）。裏張りの紙と接触している側は、一般的に検出されるエンドトキシンがありません。
9. エンドトキシン標準品や試験検体の希釈を行うのに適した容量の、妨害するエンドトキシン汚染のない*試験管*。希釈に適した容器については「検体の採取と調製」を参照してください。
10. ガラス器具の脱パイロジェン用の 250℃以上の温度に加熱できる*温熱オーブン*。一般的に使用される脱パイロジェンサイクルでは、オーブンの中の全ての器具類が少なくとも 250℃に 30 分間曝されます（2, 16, 17）。

コントロール（試験対照）

コントロールは試験の有効性を保証するために必要です。FDA（1）ならびに USP（2）、EP（3）、JP（4）により推奨手順が詳述されています。

1. エンドトキシンコントロール

a. **エンドトキシン標準品希釈系列。**試験毎にエンドトキシンの保存溶液から希釈液のセットを用時調製します。希釈した濃度での安定性を確かめていない場合は、以前に調製し、保存した希釈液を使用しないでください。エンドトキシン濃度が必要な範囲になるように、一定の割合で希釈します。エンドポイント法には 2 倍希釈をお勧めします。カイネティック法にはより大きい希釈倍率を用いることができます。標準品の希釈系列におけるエンドトキシンの最小濃度は、その試験の検出限度となり、λ と呼ばれます（**注意：**Pyrochrome® で可能なエンドポイント法とカイネティック法の検出限度はそれぞれ 0.005 EU/mL と 0.001 EU/mL です）。必要な範囲の標準品の濃度に希釈するには、精度が最大となるよう適切なピペット分注量でできるだけ希釈回数を減らします。ガラス製や適切なプラスチック製試験管中で、または直接マイクロプレート中で希釈することができます。Pyrochrome® を用いて検出できるエンドトキシンの最大濃度は方法に依存します。Pyrochrome® を使用する際の推奨加温時間を手引として参照してください。

b. 標準品の希釈系列（上記 a 参照）が陽性製品コントロール（下記 c 参照）と同じ方法で調製されていない場合、**陽性コントロール**（エンドトキシン標準品の濃度を一点）を加える必要があります。陽性コントロールのエンドトキシン濃度は、検量線の中点にある標準品の濃度と同じにします。標準品の希釈系列が 0.005、0.05、0.5、5、50 EU/mL から成る場合、陽性コントロールとして適切な濃度は 0.5 EU/mL です。陽性コントロールは、水を用いて陽性製品コントロールと同じ方法で調製する必要があります。標準品の希釈系列が試験に含まれていない場合、エンドトキシン濃度の算出に以前の（保存されている）検量線のパラメーターを用いる事が適切であることを確かめるために、陽性コントロールを試験に加える必要があります。詳しくは FDA ガイドライン（1）の「Routine Testing of Drugs by the LAL Test」の項を参照してください。

c. 陽性製品コントロールは阻害や促進のコントロールで、エンドトキシン標準品を加えた検体もしくは検体の希釈液から成ります。試験検体に加えるエンドトキシンの濃度は、陽性コントロールのエンドトキシン濃度と同じでなければなりません。陽性製品コントロールに用いる適切なエンドトキシン濃度を選択するには、上記 b 項を参照してください。加えたエンドトキシンは「スパイク」と呼ばれる事が多くあります。

2. 陰性コントロール

各試験に LRW 陰性コントロールを加える必要があります。

検体の調製 － 試験用希釈の決定

試験対象の検体の種類に対して以前に確立された試験プロトコールがある場合は、測定に必要な希釈を行い、「試験の実施」の指示に従って試験を行ってください。試験対象の検体の種類に対してプロトコールが確立されていない場合、検体の 10 倍希釈系列を作成します。試験対象製品の最大有効希釈倍数の 10 倍を超えないようにしてください。（最大有効希釈倍数（MVD）と最小有効濃度（MVC）の解説と計算は、下記の「試験の制限」もしくは FDA ガイドライン（1）を参照してください。）各検体の陽性製品コントロールとともに全検体の適切な希釈液を調製します。

試験の実施

良好な結果を得るには、一貫した手法が必要となります。コントロールと検体の試験は全て、少なくとも二重測定する必要があります。試験の準備段階での汚染を防止するように注意してください。装置類は適切に校正し、加温温度が均一である事を確認します。

1. 必要に応じて試験装置類を準備します。自動化システムでは、通常、試料の情報入力、試験パラメーターの設定、37℃に設定したインキュベーターの電源を入れることなどがあります。
2. Pyrochrome® を加えた際に適切な比になるように反応容器に適量の試料（陰性コントロール、エンドトキシン標準品、検体、陽性製品コントロール）を加えます（下記 3 参照）。

   マイクロプレートリーダーで行う試験。ライセートと試料の比を 1：1 にします。性能を最大化するには、いずれの方法（カイネティック法、エンドポイント法、ジアゾカップリング法）を用いる場合でも、0.05 mL の試料を使用します。また、カイネティック法やエンドポイント法では 0.1 mL を使用することもできますが、感度を最高にするため、もしくは検量線が広範囲（3 Log 範囲以上）である場合には 0.05 mL を使用することをお勧めします。

   Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーで行う試験。ライセートと試料の比を 1：1 もしくは 1：4 にします。Pyrochrome® LAL 試薬と試料の比が 1：1 で行う試験には 0.1 mL の試料が必要です。Pyrochrome® LAL 試薬と試料の比が 1：4 で Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーで試験を行う場合、0.2 mL の試料が必要です。
3. 用いる方法に適切な量の Pyrochrome® を加え、混和します。適切に混和されていない場合、良好な試験結果が得られない原因となります。大半のプレートリーダーには振とう機能が付いています。
   a. マイクロプレートには、ライセートと試料の比を 1：1 にし、試料の量と等量の Pyrochrome® を加えます（上記 2 参照。一般的には 0.05 mL を使用）。Pyrochrome® を出来るだけ素早く全試料に加え、5 ～ 30 秒間撹拌します。プレートをインキュベーターブロックにのせる（エンドポイント法）か、もしくは温度制御機能付きマイクロプレートリーダー（カイネティック法）の中に入れます。
   b. 個々の反応管やキュベットを用いる場合、加える Pyrochrome® の量は、試料と等量（Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーでは 0.1 mL）もしくは試料の 4 分の 1 になります（Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーでは 0.05 mL）。重要：各チューブの反応時間は同一でなければいけません。Pyros Kinetix® Flex チューブリーダーの場合、機器挿入時に反応管が検出され、時間計測が始まります。各反応容器に順番に Pyrochrome® を加え、約 2 秒間撹拌し、インキュベーター（エンドポイント法）もしくはチューブリーダー（カイネティック法）に反応用容器を入れます。

   マイクロプレートを用いるか反応用チューブを用いるかに関係なく、Pyrochrome® を加えるには連続ピペッターが便利です。

   試薬を取り扱う際には、Pyrochrome® のバイアルの汚染に注意してください。
4. 測定
   a. カイネティック法では、最小濃度のエンドトキシン標準品が onset OD405 に達するまでにかかる時間より有意に長い時間、全試料が加温されるまで試験を行います。自動化試験システムでは通常、事前にセットされた時間を過ぎると試験を終了します。推奨される標準的な加温時間については、お問い合わせください。
   b. エンドポイント法では、正確に加温時間を測定し、インキュベーターからマイクロプレートもしくは反応用管を取り出し、50% 酢酸を加えて（酢酸の終濃度が 10% 以上になる量。試料と Pyrochrome® の量が 0.05 mL の場合は 0.025 mL を加えます）反応を止め、分光光度計またはマイクロプレートリーダーを必要に応じて用い 405 nm で吸光度（OD）を測定します。各試料の加温時間が同じ（± 30 秒以内）になるように試験の準備をして、測定を行います。加温時間は必要なエンドトキシンの濃度範囲に依存し、Pyrochrome® のロットが異なると加温時間も異なる可能性があります。適切な加温時間を決めるために予備試験が必要となる場合があります。推奨される標準的な加温時間を参照してください。
   c. ジアゾカップリングを用いたエンドポイント法では、インキュベーターから反応管もしくはマイクロプレートを取り出し、0.05 mL の塩酸で溶解した亜硝酸ナトリウム（溶液 1）を添加して反応を止め、プレートを撹拌します。次いで各ウェルに 0.05 mL の溶液 2（スルファミン酸アンモニウム）を別のピペットチップで加え、撹拌します。最後に各ウェルに 0.05 mL の溶液 3（NEDA）を別のピペットチップで加え、撹拌します。ただちに赤紫色の発色が見られます。540 ～ 550 nm で吸光度を測定します。各試料の加温時間が同じ（±30 秒以内）になるように試験の準備をして、測定を行います。加温時間は必要なエンドトキシンの濃度範囲に依存し、Pyrochrome® のロットが異なると加温時間も異なる可能性があります。

適切な加温時間を決めるために予備試験が必要となる場合があります。

結果

1. 予備計算

カイネティック法では、データ補正後、試料の吸光度が特定のしきい値である吸光度（通常 0.03 OD ユニット）に達するまでの時間を計測します。吸光度は、最初の測定値をゼロ OD ユニットとした表示する必要があります。マイクロプレートリーダーの多くは、この計算を行うために必要なソフトウェアパッケージを搭載しています。OD 値に達するまでにかかる時間を onset time と呼びます。

2. 検量線の作成

a. カイネティック法には、onset time の対数をエンドトキシン標準品の濃度の対数に対して回帰させ検量線を作成します。回帰直線の方程式により検量線を作成します。

   検量線の相関係数の絶対値が 0.980 以上であれば（下記の「判定」の 2 項参照）、エンドトキシン濃度を算出するために二次多項式（二次方程式）からなる回帰線を用いることができます。

b. エンドポイント法では、測定した吸光度をエンドトキシン標準品の濃度に対してプロットし、検量線を作成します。

3. エンドトキシン濃度の算出

直線 Y = aX + b を X = (Y – b) / a に変換した方程式を用いて、全検体（標準品やコントロールを含む）中のエンドトキシン濃度を算出します。

式中：

Y = onset time の対数（カイネティック法）もしくは吸光度（エンドポイント法）

X：カイネティック法では、X = エンドトキシン濃度の対数（エンドトキシン濃度を計算するためには X の逆対数を求める必要があります）
エンドポイント法では、X = エンドトキシン濃度

a = 直線の傾き

b = Y 切片

元の希釈していない試料の濃度を求めるには、検量線から算出されたエンドトキシン濃度に試料の希釈倍数を掛けます。

これらの計算は一般的にエンドトキシン試験ソフトウェアで行います。

判定

1. 試験が有効であるためには、陰性コントロールのエンドトキシン濃度（検量線を外挿して概算します）がエンドトキシン標準品の最低濃度より有意に低くなければなりません。
2. 試験に含める検量線の相関係数が絶対値で 0.980 以上でなければなりません。
3. 陽性コントロールのエンドトキシン濃度の測定値の平均は（保存検量線を検証するために）は、表示された濃度の ±25% 以内でなければなりません。従って、陽性コントロールが 0.125 EU/mL であった場合、濃度の測定値は 0.09375 ～ 0.15625 EU/mL の間でなければなりません。
4. エンドトキシンの濃度は、エンドトキシン標準品の最小濃度から最大濃度までの範囲に限って報告することができます。この濃度の範囲から外れた検体の結果は、最小濃度以下（検出不能）または最高濃度以上として報告する必要があります。

   エンドポイント法では、有効なエンドトキシン濃度は、検量線の直線部分にある OD 値からのみ計算できます。
5. 検体が LAL やエンドトキシンの反応を有意に妨害していないことを証明するには、陽性製品コントロールのエンドトキシン濃度の測定値が、加えたエンドトキシン「スパイク」の表示濃度の 50 ～ 200% 以内でなければなりません。これらの限度値内にスパイクが収まるかを決める前に、検体（スパイクのない）のエンドトキシン濃度を引き算します。例えば、有意な妨害がないと考えるには、0.125 EU/mL の陽性製品コントロール（スパイクのない検体のエンドトキシンを引き算した後）において、エンドトキシン濃度の測定値が 0.0625 ～ 0.25 EU/mL（0.125 EU/mL の 50 ～ 200%）の範囲内でなければなりません。スパイクのない検体のエンドトキシン濃度の測定値が 0.028 EU/mL で陽性製品コントロールが 0.163 EU/mL であった場合、スパイクによるエンドトキシン濃度は 0.163-0.028=0.135 EU/mL になります。これは上記の範囲内に入り、他の条件を満たしているとすれば、この試料の試験は有効となります。

試験の制限

本試験は試験対象の検体による阻害もしくは促進の程度により制限を受けます。最小有効濃度（MVC）以上の検体濃度で試験の有効性が確認出来ない場合（1, 2）、LAL 試薬を使用する細菌エンドトキシン試験を USP 発熱性物質試験の代用にすることはできません。MVC は以下の式で算出されます。

$$MVC = \frac{(\lambda)(\text{検体投与量})}{(\text{エンドトキシン許容量})}$$

式中の単位は、λ が EU/mL、検体投与量が体重 1 kg あたりのユニット、エンドトキシン許容量が EU/kg です。

最大有効希釈倍数（MVD）は MVC を含む検体の希釈倍率です（1）。最初の検体濃度を MVC で割り算して計算します。

エンドトキシン許容量は、脊髄腔内投与の薬剤では 0.2 EU/kg、非経口的に投与される他の全製品では 5 EU/kg です。医療機器の限度値は、USP（18）に記載された方法で調製される抽出液もしくは洗浄液量 1 mL 当たりで表されます。脳脊髄液と接触しない機器では、許容量はデバイスあたり 20 EU、脳脊髄液と接触するものではデバイス当たり 2.15 EU です。FDA ガイドライン（1）によると、液状デバイスの許容量は薬剤と同じです。

セリンプロテアーゼ（例えばトリプシンや活性化血液凝固因子類）の中には試験前に変性（例えば熱処理）させていない場合、偽陽性の原因となるものがあります。動物の血清、アルブミンや血漿などの黄色を呈する物質は、*p*NA に基づく比色法を妨害することがあります。この場合にはジアゾカップリング法（Associates of Cape Cod, Inc.、カタログ番号 CD060）を使用してください。試料中の過度の濁度が試験を妨害することがあります。

予測値

検体中のエンドトキシンは、検量線を作成するために用いたエンドトキシン標準品の濃度の範囲内で定量することができます。阻害や促進を排除するために検体を希釈する必要がある場合、検出出来るエンドトキシンの最小量は希釈に応じて増加します。生物学的原料由来の物質は、生化学的に精製した後でも測定できるレベルのエンドトキシンを含んでいる可能性があります。蒸留、逆浸透、限外濾過等により得られた水は、精製工程が正しく稼働し、作られた後に汚染されていなければ、検出できる量以下のエンドトキシンしか含んでいない可能性があります。

文献

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, United States Pharmacopeia (current revision), United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
3. Bacterial Endotoxins, European Pharmacopoeia (current revision), European Pharmacopoeia Commission, Strasbourg, France.
4. Bacterial Endotoxins Test, Japanese Pharmacopoeia (current revision), Tokyo, Japan.
5. Lindsay, G. K., P. F. Roslansky, and T. Novitsky. 1989. Single-Step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin J. Clinic. Microbiol. 27:947-951.
6. 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.
7. 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.
8. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
13. 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.
14. 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.
15. Ebner, C., D. Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. 1992. Type I allergy induced by Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419.
16. Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Env. Microbiol. 36:710-714.
17. 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.
18. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Devices, chapter <161>, USP, current revision, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

弊社の経験豊かなスタッフが、LAL 試験に関する実用面や理論面についてご相談に応じます。Pyrochrome® の使用についてのご質問がある場合は電話でお問い合わせください。製品仕様にそぐわない弊社製品は全て交換いたします。返品前にカスタマーサービスにご連絡ください。

日本語の使用説明書は*ACC*社のホームページ（*http://www.acciusa.com/lal/productinserts/pyrochrome.html*）から入手することができます。