

Lysat d'améboocyte de *limule*

FLACON À USAGE MULTIPLE DE PYROTELL®

| | |
|---------------------------|---|
| Fabriqué par : | Téléphone : (508) 540-3444 |
| | Numéro vert : (888) 395-2221 |
| | Fax : (508) 540-8680 |
| | Assistance technique : (800) 848-3248 |
| | Service à la clientèle : (800) 525-8378 |
| PN000858 rev6 04 jan 2019 | |

Flacon à usage multiple de Pyrotell®

pour la détection et la quantification des endotoxines des bactéries à Gram négatif (lipopolysaccharides)

Le test du lysat d'améboocyte de *limule* (LAL) peut être remplacé par le test pyrogène de la U.S. Pharmacopeia (USP) (test de la fièvre du lapin) pour l'analyse sur produit fini des « médicaments injectables destinés aux êtres humains (incluant les produits biologiques) ou aux animaux, et les dispositifs médicaux ». Le test LAL est recommandé pour le dosage des endotoxines dans les matières premières utilisées dans la production, y compris l'eau, et pour la surveillance en cours de fabrication des niveaux d'endotoxines. Le test d'endotoxines bactériennes USP (1) est le test officiel référencé dans les monographies USP spécifiques.

Résumé du test

Le lysat d'améboocyte de *limule* (LAL) est un extrait aqueux de cellules sanguines (améboocytes) de la limule, *Limulus polyphemus*. Le test LAL est effectué en ajoutant 0,1 mL de Pyrotell reconstitué à 0,1 mL de l'échantillon de test dans un tube réactionnel en verre sodocalcique dépyrogéné de 10 x 75 mm. La solution réactionnelle est bien mélangée et placée immédiatement dans un incubateur à sec ou dans un bain-marie sans circulation à 37 ± 1 °C pendant 60 ± 2 minutes. À la fin de la période d'incubation, le tube est retiré de l'incubateur et retourné. Si un gel s'est formé et reste intact au fond du tube réactionnel après retournement de 180°, la concentration en endotoxines dans le tube est supérieure ou égale à la sensibilité du Pyrotell. Tout autre état du mélange réactionnel constitue un résultat négatif indiquant une concentration en endotoxines inférieure à la sensibilité du Pyrotell. Même si un gel s'est formé mais qu'il se brise ou s'effondre lors du retournement, le test est négatif. Le test LAL est rapide, spécifique, facile à exécuter et hautement sensible. Le Pyrotell peut détecter une quantité aussi faible que 0,03 unité d'endotoxine (UE) par mL à l'aide de la technique par caillot de gel.

Historique et principe biologique

Howell a décrit la coagulation du sang de *limule* en 1885 (3). Dans les années 1950, Bang, au Marine Biological Laboratory (Woods Hole, MA), a découvert que des bactéries à Gram négatif provoquent la coagulation du sang de *limule* (4). Levin et Bang avaient déterminé plus tard que la réaction est enzymatique et que les enzymes se trouvent dans les granules des améboocytes (5). Ils ont montré que la coagulation est déclenchée par un composant structurel unique de la paroi cellulaire bactérienne, appelé endotoxine ou lipopolysaccharide (6). On pense actuellement savoir que la réaction menant à la formation du caillot est une cascade formée de plusieurs étapes d'activation enzymatique. Alors qu'on ne comprend pas encore la totalité de la réaction, la dernière étape est bien décrite. La protéine de coagulation (coagulogène) est clivée par l'enzyme de coagulation activée; les produits du clivage insolubles coalescent par interaction ionique pour former la matrice de gel.

Plus d'informations sur la réaction LAL et ses applications sont disponibles dans la littérature (7, 8, 9).

Réactif

Le lysat d'améboocyte de *limule* (LAL) Pyrotell est conditionné sous forme lyophilisée dans des flacons de 2 et de 5 mL.

Associates of Cape Cod, Inc. propose des lots individuels de Pyrotell dans une plage de sensibilités allant de 0,03 à 0,5 UE/mL selon l'étalon de référence des endotoxines USP (également appelée endotoxine étalon de référence ou RSE). La sensibilité (λ) est la concentration minimale en RSE qui produit un caillot de gel ferme dans des conditions normales. La sensibilité du lot (UE/mL) est imprimée sur l'étiquette de l'emballage et du flacon. Préciser la sensibilité souhaitée lors de la commande.

Utiliser le Pyrotell uniquement à des fins de diagnostic in vitro. Ne pas l'utiliser pour la détection de l'endotoxémie. La toxicité de ce réactif n'a pas été déterminée; par conséquent, la prudence est de mise lors de la manipulation du Pyrotell.

Reconstituer le Pyrotell comme suit :

1. Tapoter sur le flacon de Pyrotell pour faire descendre le LAL libre en bas du flacon. Enlever la capsule et casser le vide en soulevant le bouchon gris. Ne pas contaminer l'ouverture du flacon. Ne pas injecter par le bouchon ni le réutiliser. La présence d'une petite quantité de LAL sur le bouchon n'affecte pas le test. Couvrir le flacon de Parafilm « M »® (American National Can™) lorsqu'il n'est pas utilisé.
2. Reconstituer le Pyrotell avec de l'eau de réactif LAL (LRW, consulter la rubrique « Réactifs de test ») ou un tampon compatible (Associates of Cape Cod, Inc.). Ajouter 2,0 ou 5,0 mL comme indiqué sur l'étiquette du flacon. La pastille lyophilisée de LAL se dissout en quelques minutes. Avant utilisation, mélanger délicatement le contenu du flacon pour en garantir l'homogénéité. Un mélange trop vigoureux peut causer un moussage excessif qui peut entraîner une perte de sensibilité.

Conditions de stockage

Le Pyrotell lyophilisé est relativement stable à la chaleur. S'il est conservé au réfrigérateur, il gardera sa pleine activité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Dès réception, conserver le produit à une température de -20 à +8 °C. Les températures inférieures à -20 °C rétrécissent le bouchon, entraînant une perte de vide et une contamination possible du Pyrotell. Des températures supérieures à 37 °C peuvent causer une détérioration rapide du Pyrotell lyophilisé, comme en témoignent la perte de sensibilité et un jaunissement marqué du produit. Pyrotell est expédié avec des poches de glace dans des contenants isolés pour le protéger des températures élevées.

Le réactif Pyrotell reconstitué est généralement transparent et légèrement opalescent. Un lot occasionnel présentera une légère turbidité uniforme. La présence de petites fibres ou de filaments n'indique pas une contamination ni n'affecte l'activité; cependant, une précipitation de floculant ou une couleur jaune distincte indiquent la détérioration.

Le réactif Pyrotell reconstitué est moins stable que le produit lyophilisé; les flacons peuvent être maintenus jusqu'à 24 heures entre 2 et 8 °C. Le réactif Pyrotell reconstitué peut être congelé une seule fois. Le produit conservera son activité pendant trois mois s'il est congelé immédiatement après reconstitution et maintenu à une température inférieure ou égale à -20 °C. Après décongélation, il convient d'appliquer les mêmes critères visuels de qualité que pour la reconstitution initiale.

Collecte et préparation de l'échantillon

Les échantillons doivent être collectés de façon aseptique dans des contenants non pyrogènes. L'utilisation d'une verrerie réutilisée dépyrogénée ou de plastique de polystyrène stérile jetable est recommandée pour minimiser l'adsorption de l'endotoxine par les surfaces du contenant. Tous les contenants en plastiques ne sont pas exempts d'endotoxines détectables et une substance qu'il est possible d'extraire de certains types peut interférer avec le test LAL. Les contenants (choisis aléatoirement à partir d'un lot) peuvent être rincés avec un petit volume d'eau de réactif LAL (à température ambiante pendant une heure), et la solution de rinçage résultante peut être analysée comme un échantillon pour déterminer si le lot est acceptable.

Le pH du mélange réactionnel (échantillon ajouté au Pyrotell) doit être de 6 à 8. Ajuster le pH de l'échantillon en ajoutant du HCl, NaOH (exempt d'endotoxines détectables), ou un tampon compatible (voir n° 3 ci-dessous). Diluer la solution concentrée de HCl ou de NaOH avec de l'eau de réactif LAL et utiliser des quantités normales qui n'entraîneront pas une dilution significative de l'échantillon de test. Ne pas ajuster le pH d'une solution saline ou de l'eau non tamponnées.

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

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

Procédure de test

Réactifs de test

1. Flacon à usage multiple de Pyrotell (voir description et méthode de reconstitution dans la rubrique ci-dessus).
2. LRW, non fournie avec Pyrotell; commander séparément. Le Pyrotell lyophilisé doit être reconstitué avec de l'eau qui ne présente aucune endotoxine détectable dans le test LAL. Les sources d'eau recommandées incluent l'eau stérile Associates of Cape Cod, Inc. ou l'eau stérile USP pour irrigation ou injection (EPI stérile, sans bactériostatique). La limite d'endotoxines relative à l'eau USP pour irrigation ou injection est de 0,25 UE/mL; par conséquent, l'eau pour irrigation ou injection peut présenter des endotoxines détectables lorsqu'elle est testée avec un Pyrotell plus sensible. Pour certifier un nouveau lot d'eau en tant que LRW, reconstituer le Pyrotell et diluer l'endotoxine étalon avec le nouveau lot d'eau pour confirmer la sensibilité du Pyrotell. Si la sensibilité du lot au test est confirmée et que le contrôle négatif ne montre aucune augmentation de la viscosité et aucune précipitation floconneuse, l'eau peut être utilisée. Utiliser de la LRW pour reconstituer le Pyrotell et les étalons d'endotoxines et pour diluer les étalons d'endotoxines et les échantillons testés.
3. Tampon, non fourni avec le Pyrotell; commander séparément si nécessaire. Le tampon Pyrosol (réf. catalogue BR051 ou BC554) ou le tampon Glucashield™

(réf. catalogue GB051) peut être utilisé à la place de l'eau de réactif LAL pour reconstituer le Pyrotell afin de permettre de pallier un problème de pH de l'échantillon ou une interférence avec des glucanes.

4. Endotoxine étalon, non fournie avec le Pyrotell; commander séparément. L'endotoxine étalon de contrôle (CSE), obtenue auprès d'Associates of Cape Cod, Inc., est utilisée pour confirmer la sensibilité du Pyrotell, valider le produit et préparer des contrôles d'inhibition. Chaque flacon contient un poids mesuré d'endotoxines. L'étalon de référence des endotoxines USP peut être obtenu auprès de l'U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Suivre les instructions du fabricant pour la reconstitution et le stockage des endotoxines étalons. Les lots de CSE peuvent présenter différentes puissances (UE/ng) quand ils sont testés avec différents lots de Pyrotell. Demander un certificat d'analyse pour la puissance d'une endotoxine étalon de contrôle avec un lot spécifié du Pyrotell.

Matières et équipements (non fournis)

1. Tubes réactionnels, 10 x 75 mm, dépyrogénés, verre sodocalcique (réf. catalogue TS050). Certaines marques présentent des propriétés inhibitrices avec certains lots de Pyrotell. Des tubes dépyrogénés sont disponibles auprès d'Associates of Cape Cod, Inc.
2. Bain-marie sans circulation ou incubateur à sec (réf. catalogue TH120) capable de maintenir une température de 37 ± 1 °C.
3. Racks à tubes à essais pour maintenir et/ou incuber les tubes réactionnels.
4. Pipettes, dispositifs de pipetage automatique avec embouts de pipettes, ou dispositifs de pipetage répété avec cylindres de seringue en plastique. Des consommables stériles sont recommandés.
5. Agitateur-mélangeur de type vortex.
6. Parafilm « M »®. Le côté en contact avec le support en papier est normalement non pyrogène.
7. Tubes à essais non pyrogènes d'un volume suffisant pour diluer l'étalon d'endotoxines ou l'échantillon de test. Voir « Collecte et préparation de l'échantillon » pour d'autres contenants convénables pour les dilutions.
8. Four à air chaud capable d'atteindre 250 °C pour la dépyrogénéation de la verrerie. Les réglages de temps et de température minimum couramment utilisés sont de 30 minutes à 250 °C (2, 11).

Contrôles

Les contrôles sont nécessaires pour assurer la validité du test. Les procédures recommandées sont détaillées par la FDA (1) et l'USP (2).

1. Contrôles d'endotoxine

a. Série étalon d'endotoxines. Préparer chaque jour un nouveau jeu de dilutions en série appropriées à partir de la solution d'endotoxine mère et mélanger chaque dilution à l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex pendant au moins 30 secondes. Diluer de façon à ce que la série finale de dilutions doubles englobe la sensibilité (λ) du Pyrotell. Des concentrations de 2 λ , λ , 0,5 λ et 0,25 λ sont recommandées pour confirmer la sensibilité du Pyrotell. Utiliser aussi peu de dilutions que possible avec des volumes de pipette appropriés pour maximiser la précision.

b. Des contrôles positifs peuvent être utilisés en l'absence d'une série de concentrations étalons dans certaines circonstances. Se reporter à la directive de la

FDA (1) dans la rubrique « Tests de routine des médicaments par le test LAL » pour les détails. La concentration du contrôle positif doit être de 2λ.

- c. Les **contrôles positifs du produit** sont des contrôles d'inhibition et se composent de l'échantillon ou de l'échantillon dilué auquel l'endotoxine étalon est ajoutée. La concentration finale en endotoxines ajoutées dans l'échantillon de test doit être de 2λ.

2. Contrôles négatifs

Le(s) contrôle(s) négatif(s) de LRW doivent être inclus dans chaque lot d'échantillons testés. Lors de la validation du produit ou des tests d'inhibition/de désinhibition (1, 2), l'échantillon utilisé pour diluer l'endotoxine étalon est également traité comme un contrôle négatif.

Préparation de l'échantillon pour le test ou l'analyse des limites

Soit diluer l'échantillon jusqu'à la concentration requise pour effectuer un test des limites (réussite/échec), soit effectuer une analyse en testant une série de concentrations (des exemples des deux types de tests figurent dans la rubrique « Résultats et interprétation »). Les dilutions peuvent être effectuées dans des tubes à essais et le volume testé transféré dans les tubes réactionnels, ou les dilutions peuvent être effectuées directement dans les tubes réactionnels pour laisser le volume testé, soit 0,1 mL, dans chaque tube. La dilution testée dans le cadre d'un test des limites est déterminée à partir de la sensibilité du Pyrotell et de la limite d'endotoxines de l'échantillon. Consulter la rubrique « Limitations de la procédure » ou la directive de la FDA (1) pour l'explication et le calcul de la concentration minimale acceptable (MVC) et de la dilution maximale acceptable (MVD).

Réalisation du test

Une **technique cohérente** est nécessaire pour obtenir des résultats satisfaisants.

- Ajouter 0,1 mL de Pyrotell reconstitué dans chaque tube réactionnel contenant 0,1 mL de l'échantillon de test ou de contrôle. Utiliser une pipette graduée (par incréments de 0,1 mL) ou un dispositif de pipetage automatique ou répété. Ajouter le Pyrotell au(x) contrôle(s) négatif(s) en premier et de la concentration la plus faible à la plus élevée dans chaque série de tests où la contamination par transfert peut poser un problème. Il est recommandé d'utiliser une pipette ou un embout de pipette neuf pour chaque prélèvement dans le flacon de Pyrotell. Agiter vigoureusement le rack à tubes pendant 20 à 30 secondes pour garantir un mélange homogène. S'il n'y a que quelques tubes, chacun peut être mélangé à l'aide d'un agitateur-mélangeur vortex pendant 1 à 2 secondes. Le fait de ne pas bien mélanger est une cause fréquente de tests insatisfaisants.
- Placer les tubes réactionnels dans de l'eau ou dans un bain sec à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 60 ± 2 minutes. La réaction commence lorsque le LAL est ajouté à l'échantillon de test mais ne se poursuit pas à un rythme optimal tant que le mélange n'atteint pas 37°C . Si un grand nombre d'échantillons sont testés en parallèle, les tests doivent être groupés en lots et lancés à des intervalles permettant la lecture de chaque échantillon dans les délais impartis.

Ne pas toucher les tubes réactionnels pendant la période d'incubation. La réaction de gélification est délicate et peut se terminer de façon irréversible si les tubes sont manipulés, agités ou soumis à des vibrations. Ne pas utiliser un bain-marie avec un agitateur ou une autre source de vibration. Immerger les tubes au-dessus du niveau du mélange réactionnel, mais pas trop profondément pour qu'ils ne flottent ou ne se déplacent pas dans les racks.

- Retirer et lire les tubes réactionnels un à la fois. Ne pas essuyer les tubes et ne pas cogner le côté du rack pendant leur retrait. Retourner le tube d'un seul mouvement régulier; ne pas s'interrompre à mi-chemin lors du retournement sauf s'il est évident que le gel ne s'est pas formé. Un test positif est indiqué par la formation d'un gel qui ne s'affaisse pas lorsque le tube est retourné.

Résultats et interprétation

Exemple de série étalon d'endotoxines

Confirmer la sensibilité du Pyrotell et former le laboratoire ou le technicien en effectuant le test LAL sur une série de concentrations en endotoxines étalons connues (1, 2) qui englobe la sensibilité indiquée sur l'étiquette (c.-à-d. 2λ , λ , $0,5\lambda$ et $0,25\lambda$). Pour cet exemple, la sensibilité du Pyrotell (λ) est de 0,25 UE/mL :

| Concentration en endotoxines | Résultat du test |
|------------------------------|------------------|
| 0,5 UE/mL (2λ) | + |
| 0,25 UE/mL (λ) | + |
| 0,125 UE/mL ($0,5\lambda$) | - |
| 0,06 UE/mL ($0,25\lambda$) | - |
| LRW (contrôle négatif) | - |

Le résultat final de cette analyse est défini comme étant la concentration minimale en endotoxines permettant d'obtenir un test positif. La sensibilité indiquée sur l'étiquette du Pyrotell est confirmée si le résultat final est λ plus ou moins une dilution double. Dans cet exemple, la concentration en endotoxines dans le dernier tube positif de la série est de 0,25 UE/mL ou λ ; la sensibilité est donc confirmée. Le test serait valide (sensibilité confirmée) si le résultat final était de 0,125 à 0,5 UE/mL (l'erreur de la méthode). Pour afficher un résultat final de 0,125 UE/mL, le niveau de 0,06 UE/mL doit être présent dans la série et être négatif.

Lorsque l'analyse d'endotoxines est répétée, la sensibilité est exprimée comme la moyenne géométrique (MG) des sensibilités individuelles :

$$MG = \text{antilog} ((\Sigma c)/f)$$

où Σc = somme du logarithme des résultats finaux, et f = nombre de résultats finaux répétés.

Le **contrôle négatif** de l'eau de réactif LAL doit donner un test négatif. Si le contrôle négatif coagule, l'eau de réactif LAL, la verrerie, ou le Pyrotell est contaminé. Le mélange doit être transparent sans augmentation de la viscosité. Une précipitation floconneuse indique une concentration en endotoxines inférieure à la sensibilité du Pyrotell.

En l'absence de la série d'endotoxines (1), un **contrôle positif** peut être inclus avec les tests. Le contrôle positif à 2λ est le niveau de 0,5 UE/mL dans l'exemple ci-dessus. Si le contrôle positif est négatif, la sensibilité du Pyrotell est inférieure au double de la sensibilité indiquée sur l'étiquette et le test de l'échantillon est invalide. Une perte de sensibilité peut signifier que le Pyrotell s'est détérioré, que l'endotoxine a perdu de sa puissance (souvent à cause de l'adsorption à la surface du contenant), ou que le test n'a pas été effectué correctement.

Exemple de test des limites (réussite/échec)

Il est possible de tester une concentration d'échantillon avec une sensibilité donnée du Pyrotell et de faire en sorte que le résultat indique si l'échantillon de test contient ou non plus ou moins d'endotoxines que sa limite. Dans cet exemple, la concentration de l'échantillon est de 1 mg/mL et la limite d'endotoxines souhaitée ou prédéterminée pour l'échantillon est de 3 UE/mg (consulter la rubrique « Limitations de la procédure »). La limite exprimée en UE/mL,

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

est supérieure à la sensibilité du Pyrotell, 0,25 UE/mL, l'échantillon doit donc être dilué pour effectuer un test dont l'issue est une réussite ou un échec. Déterminer la dilution de l'échantillon qui indiquera une réussite, < 3 UE/mL, ou un échec, ≥ 3 UE/mL, en divisant la limite d'endotoxines en UE/mL par la sensibilité du LAL :

$$3 \text{ UE/mL} / 0,25 \text{ UE/mL} = 12.$$

Combiner une part d'échantillon avec 11 parts de LRW pour préparer la dilution 1:12 et tester. Le résultat indiquera si l'échantillon a réussi le test à la limite de 3 UE/mL. Des contrôles positifs du produit sont inclus à la dilution de l'échantillon pour écarter la possibilité de faux négatifs.

Exemple d'analyse d'un échantillon

L'endotoxine est quantifiée dans une analyse en trouvant le résultat final dans une série de dilutions d'échantillon. Dans l'exemple ci-dessous, l'échantillon est dilué avec de la LRW et les dilutions du tableau sont testées; λ est de 0,25 UE/mL. Les résultats sont soit positifs soit négatifs.

| Dilution de l'échantillon | Résultat du test |
|---------------------------|------------------|
| non dilué | + |
| 1:2 | + |
| 1:4 | + |
| 1:8 | - |
| 1:16 | - |
| 1:32 | - |
| contrôle négatif | - |

Pour calculer la concentration en endotoxines dans l'échantillon, multiplier la sensibilité du Pyrotell (λ) par la valeur réciproque de la dilution au point final :

$$\text{Conc.} = (\lambda)(4/1) = (0,25 \text{ UE/mL})(4) = 1 \text{ UE/mL}.$$

La concentration pour les analyses répétées est exprimée sous forme de moyenne géométrique.

Un **contrôle positif du produit** (échantillon dopé à l'endotoxine étalon à 2λ) doit être présent et mener à un test positif pour exclure les faux négatifs. Si le contrôle positif du produit est négatif et le contrôle positif est positif, l'échantillon interfère avec (inhibe) le test LAL. L'échantillon doit être réanalysé à une plus grande dilution (sans dépasser la MVD; consulter la rubrique « Limitations de la procédure »).

Limitations de la procédure

La procédure est limitée par la capacité de l'échantillon à inhiber ou à désinhiber le test LAL. Si la procédure ne peut pas être validée (1, 2) à une concentration d'échantillon supérieure à la concentration minimale acceptable (MVC), le test LAL ne peut pas remplacer le test pyrogène USP. La MVC est calculée comme suit :

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

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

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

La limite de tolérance aux endotoxines (1) est de 0,2 UE/kg pour les médicaments administrés par voie intrathécale et de 5 UE/kg pour tous les autres produits parentéraux. La limite pour les dispositifs médicaux est exprimée par mL d'un volume d'extraction ou de rinçage obtenu comme décrit dans la directive de la FDA (1). Pour les dispositifs entrant en

contact avec le liquide céphalo-rachidien (LCR), la limite est de 0,06 UE/mL; pour ceux qui n'entrent pas en contact avec le LCR, elle est de 0,5 UE/mL. La limite pour les dispositifs liquides est la même que pour les médicaments.

La trypsine provoquera un faux résultat positif à moins d'être dénaturée par un traitement thermique avant le test. Des substances telles que le sang, le sérum et le plasma doivent être traitées pour inactiver les inhibiteurs avant le test (12).

Valeurs attendues

Les endotoxines peuvent être quantifiées si la concentration est supérieure ou égale à la sensibilité du Pyrotell. Les substances dérivées de sources biologiques, même après purification biochimique, peuvent encore contenir des niveaux mesurables d'endotoxines. L'eau obtenue par distillation, osmose inverse ou ultrafiltration peut contenir moins d'endotoxines que détectable tant que le processus de purification fonctionne correctement et que l'eau n'est pas contaminée après la production.

Caractéristiques spécifiques de performance

L'erreur de la méthode par caillot de gel est de plus ou moins un doublement de la dilution à la fin de l'analyse.

Bibliographie

- Test d'endotoxines bactériennes, USP actuelle.
 - Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, Callinectes hastatus, and Cumularia sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
 - Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.
 - Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
 - 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.
 - 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.
 - Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
 - Progress in Clinical and Biological Research Vol. 231, Detection of Bacterial Endotoxins with the *Limulus* Amebocyte Lysate Test. 1987. Watson, S. W., J. Levin, and T. J. Novitsky (eds), Alan R. Liss, Inc., NY.
 - Tsuji, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
 - 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.
 - 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.
- Notre personnel expérimenté discutera volontiers avec vous des aspects pratiques et théoriques du test LAL. Veuillez téléphoner si vous avez des problèmes à utiliser Pyrotell. Nous remplacerons tous nos produits qui ne répondent pas aux spécifications; vous devez nous en aviser avant de les retourner.