

Lisato degli amebociti del *Limulus*

PYROTELL® MTV

Prodotto da:	Telefono: (508) 540-3444
	Numero verde: (888) 395-2221
	Fax: (508) 540-8680
	Assistenza tecnica: (800) 848-3248
	Assistenza clienti: (800) 525-8378

PN000858 rev6 04 gen 2019

Fiala multitest Pyrotell®

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

Il test del lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL), può sostituire il test dei pirogeni (test della febbre dei conigli), riconosciuto dalla Farmacopea Statunitense (USP), per i test a prodotto finito di "farmaci iniettabili per uso umano (inclusi i prodotti biologici), farmaci iniettabili per uso veterinario e dispositivi medici." Il test LAL è consigliato per la determinazione quantitativa delle endotossine nelle materie prime utilizzate per la produzione, compresa l'acqua, e per il monitoraggio di processo dei livelli di endotossina. Il Bacterial Endotoxins Test (1) della farmacopea statunitense (USP) è il test ufficiale a cui si fa riferimento in specifiche monografie USP.

Breve descrizione del test

Il lisato degli amebociti del *Limulus* è un estratto acquoso di cellule ematiche (amebociti) del granchio a ferro di cavallo, il *Limulus polyphemus*. Il test LAL viene eseguito aggiungendo 0,1 mL di Pyrotell ricostituito a 0,1 mL del campione di analisi in una provetta di reazione da 10 x 75 mm deprogenata in vetro sodicoalcalico. La soluzione di reazione viene mescolata bene e posta immediatamente in un incubatore a secco, oppure in un bagnomaria senza circolazione di acqua a 37 ± 1 °C per 60 ± 2 minuti. Al termine del periodo di incubazione la provetta viene rimossa dall'incubatore e capovolta. Il test è positivo se sul fondo della provetta di reazione si è formato un gel che rimane intatto dopo l'inversione di 180°; la concentrazione di endotossina presente nella provetta è maggiore o uguale alla sensibilità del Pyrotell. Se la miscela di reazione appare in qualsiasi altro stato significa che il test è negativo e la concentrazione di endotossina è minore della sensibilità del Pyrotell. Il test è negativo anche se il gel si è formato ma si rompe o collassa durante l'inversione. Il test LAL è rapido, specifico, semplice da eseguire e altamente sensibile. Utilizzando la tecnica di gelificazione (gel-clot), il Pyrotell è in grado di rilevare fino a 0,03 unità endotossiniche (EU) per mL.

Antecedenti e principio biologico

Nel 1885 Howell descrisse la coagulazione del sangue del *Limulus* (3). Negli anni cinquanta, presso il Marine Biological Laboratory (laboratorio biologico marino) di Woods Hole, nello stato del Massachusetts, Bang scoprì che i batteri gram-negativi provocavano la coagulazione del sangue del *Limulus* (4). Levin e Bang determinarono successivamente che la reazione era enzimatica e che gli enzimi si trovavano nei granuli degli amebociti (5). Dimostrarono che la coagulazione ha inizio da un unico componente strutturale presente nella parete della cellula batterica chiamato endotossina o lipopolisaccaride (6). In base alle conoscenze attuali si ritiene che la reazione che porta alla formazione di coaguli sia una cascata di passaggi di attivazione enzimatica. Sebbene la reazione completa non sia chiara, l'ultimo passaggio è ben descritto. La proteina coagulabile (coagulogeno) viene scissa mediante l'enzima coagulante attivato e i prodotti insolubili della scissione si uniscono tramite interazione ionica e formano la matrice di gel. Maggiori informazioni sulla reazione chimica LAL e le sue applicazioni sono reperibili nella letteratura (7, 8, 9).

Reagente

Il lisato degli amebociti del *Limulus* (LAL) Pyrotell è confezionato in forma liofilizzata in fiale da 2 e 5 mL.

Associates of Cape Cod, Inc. offre lotti individuali di Pyrotell con sensibilità comprese fra 0,03 e 0,5 EU/mL, in conformità alla USP Endotoxin Reference Standard (endotossina standard di riferimento della farmacopea statunitense, nota anche come Reference Standard Endotoxin o RSE). La sensibilità, λ , è la concentrazione minima di RSE in grado di coagulare in modo compatto il gel in presenza di condizioni standard. La sensibilità del lotto, in EU/mL, è stampata sulla fiala e sulle etichette della confezione. Specificare la sensibilità desiderata al momento dell'ordinazione.

Utilizzare Pyrotell esclusivamente per fini diagnostici in vitro. Non utilizzare questo prodotto per rilevare l'endosseemia. Esercitare cautela quando si maneggia Pyrotell perché la tossicità di questo reagente non è stata determinata.

Ricostituire Pyrotell come indicato di seguito:

1. Picchiare leggermente la fiala di Pyrotell per far cadere sul fondo della fiala il LAL sciolto. Togliere la guarnizione agganciata ed eliminare il vuoto sollevando il tappo grigio. Non contaminare l'imboccatura della fiala. Non iniettare attraverso il tappo né riutilizzarlo. Una piccola quantità di LAL rimanente sul tappo non influirà sull'esito del test. Quando non è in uso, coprire la fiala con Parafilm "M"[®] (American National CanTM).
2. Ricostituire Pyrotell con reagente acqua per LAL (LRW, vedere "Reagenti del test") o con tampone compatibile (Associates of Cape Cod, Inc.). Aggiungere 2,0 o 5,0 mL come indicato sull'etichetta della fiala. Il pellet LAL liofilizzato si dissolverà entro pochi minuti. Prima dell'uso, miscelare con delicatezza il contenuto della fiala per garantire omogeneità. Una miscelazione troppo vigorosa può creare una quantità eccessiva di schiuma e causare perdita di sensibilità.

Condizioni di conservazione

Il Pyrotell liofilizzato è relativamente resistente al calore e, se conservato refrigerato, manterrà la completa attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala. Al ricevimento del prodotto, conservarlo a una temperatura compresa fra -20 °C e +8 °C. Le temperature inferiori a -20 °C provocano la contrazione del tappo, e portano a una perdita del vuoto e all'eventuale contaminazione del Pyrotell. Le temperature superiori a 37 °C possono causare il rapido deterioramento del Pyrotell liofilizzato, evidenziato da una perdita di sensibilità e un'evidente colorazione giallastra del prodotto. Pyrotell viene spedito in contenitori isolati termicamente insieme a buste contenenti ghiaccio che lo proteggono da temperature elevate.

Il Pyrotell 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.

Il Pyrotell ricostituito è meno stabile del prodotto liofilizzato; le fiale possono essere conservate per non più di 24 ore a 2-8 °C. Il Pyrotell ricostituito può essere congelato una sola volta. Il prodotto manterrà la sua attività per tre mesi se congelato immediatamente dopo la ricostituzione e mantenuto a -20 °C o a temperature inferiori. Una volta scongelato, si applicano gli stessi criteri visivi per la determinazione della qualità indicati per la ricostituzione iniziale.

Prelievo e preparazione dei campioni di analisi

I campioni di analisi devono essere raccolti asetticamente in contenitori apirogeni. Si consiglia l'utilizzo di vetreria riutilizzabile deprogenata o di contenitori in plastica, sterili e monouso, in plastica di polistirene per ridurre al minimo l'adsorbimento dell'endotossina alle superfici dei contenitori. Non tutti i contenitori in plastica sono esenti da endotossina rilevabile; le sostanze estraibili da alcune materie plastiche possono interferire con il test LAL. I contenitori (selezionati a caso da un lotto) possono essere risciacquati con un piccolo volume di LRW (lasciata a temperatura ambiente per un'ora), e poi si può analizzare la soluzione di

risciacquo come se si trattasse di un campione di analisi per determinare se il lotto è o non è accettabile.

Il pH della miscela di reazione (compagnone aggiunto al Pyrotell) deve essere compreso tra 6 e 8. Correggere il pH del campione di analisi con HCl o NaOH (esente da endotossina rilevabile) o un tampone compatibile (vedere il punto 3 sotto). Diluire il componente HCl o NaOH concentrato con LRW fino a raggiungere un livello accettabile che non comporti una significativa diluizione del campione di analisi una volta corretto. Non correggere il pH di soluzioni fisiologiche non tamponate o acqua.

Le sostanze che denaturano le proteine, chelano i cationi, legano le endotossine o alterano il loro stato idrofobico possono causare interferenza nel test. L'interferenza può essere rilevata mediante il recupero di endotossina, notevolmente maggiore o minore di quella prevista quando una quantità nota di endotossina standard viene aggiunta al campione di analisi (vedere "Limiti della procedura"). Nella maggioranza dei casi, la diluizione del campione di analisi riduce la concentrazione e l'attività delle sostanze interferenti, consentendo comunque di ottenere risultati validi. I controlli e gli schemi di diluizione adeguati sono trattati nella sezione "Procedura di analisi".

I campioni di analisi vanno analizzati appena possibile dopo il prelievo. Può essere utile congelare un campione di analisi non sterile da conservare o spedire prima del test. I campioni di analisi con presunte basse concentrazioni di endotossina (meno di 1 EU/mL) devono essere testati per valutare l'eventuale perdita di endotossina durante la conservazione.

Procedura di analisi

Reagenti del test

1. Fiala *multitest Pyrotell* (leggere la descrizione ed il metodo di ricostituzione descritto nella sezione sopra indicata).
2. *LRW*, non fornito con Pyrotell; ordinare separatamente. Pyrotell liofilizzato deve essere ricostituito con acqua senza endotossine rilevabili con il test LAL. Le fonti d'acqua consigliate includono Associates of Cape Cod, Inc. oppure l'acqua sterile per iniezione o per irrigazione (Sterile Water for Injection or Irrigation o WFI, senza agenti batteriostatici) USP. Il limite endotossinico nella WFI della Farmacopea Statunitense è di 0,25 EU/mL, pertanto la WFI potrebbe presentare endotossine rilevabili qualora testata con un Pyrotell maggiormente sensibile. Per certificare un nuovo lotto di acqua come LRW, ricostituire il Pyrotell ed effettuare diluizioni dell'endotossina standard con il nuovo lotto di acqua per confermare la sensibilità del Pyrotell. Se la sensibilità del test del lotto in esame è stata confermata e il controllo negativo indica la mancanza di aumento della viscosità e della precipitazione flocculante, l'acqua è adatta per l'uso. Utilizzare LRW per ricostituire Pyrotell e le endotossine standard e per diluire le endotossine standard ed i campioni di analisi.
3. *Tampone*, non fornito insieme a Pyrotell; ordinare separatamente se necessario. Il tampone Pyrosol (n. di catalogo BR051 o BC554) o il tampone GlucashieldTM (n. di catalogo GB051) può essere usato al posto dell'LRW per ricostituire Pyrotell e risolvere un problema di pH del campione o l'interferenza ad opera dei glucani.
4. *Endotossina standard*, non fornita insieme a Pyrotell; ordinare separatamente. Endotossina standard di controllo (CSE), reperibile presso Associates of Cape Cod, Inc., usata per confermare la sensibilità del Pyrotell, convalidare il prodotto e preparare i controlli di inibizione. Ciascuna fiale contiene una quantità di peso misurata di endotossina. L'endotossina standard di riferimento USP può essere richiesta alla U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Seguire le istruzioni dei produttori relative alla ricostituzione e alla conservazione delle endotossine standard. I lotti di CSE possono mostrare concentrazioni differenti (EU/ng) quando testate con diversi lotti di Pyrotell. Richiedere un certificato di analisi che indichi la concentrazione di una CSE con un lotto specifico di Pyrotell.

Materiali e apparecchiature (non forniti)

1. *Provette di reazione*, 10 x 75 mm, deprogenate, vetro sodicoalcalico (n. di cat. TS050). Alcune marche presentano

proprietà inibitorie con alcuni lotti di Pyrotell. Le provette deprogenate sono disponibili presso Associates of Cape Cod, Inc.

2. *Bagnomaria senza circolazione di acqua*, oppure incubatore (n. di cat. TH120) a secco, in grado di mantenere una temperatura di 37 ± 1 °C.
3. *Rastrelliere portaprovette* per l'inserimento e/o l'incubazione delle provette di reazione.
4. *Pipette*, pipettatori automatici con puntali o pipettatori a ripetizione con cilindri delle siringhe in plastica. Si consiglia l'uso di prodotti sterili monouso.
5. *Miscelatore di tipo vortex*.
6. *Parafilm "M"*[®]. Il lato a contatto con il rivestimento in carta è normalmente apirogeno.
7. *Provette per analisi apirogene* di capacità adeguata per eseguire le diluizioni dello standard di endotossina o del campione di analisi. Per informazioni sugli altri contenitori idonei per le diluizioni, vedere "Prelievo e preparazione dei campioni di analisi".
8. *Stufa ad aria calda* in grado di raggiungere una temperatura di 250 °C per la deprogenazione della vetreria. Le impostazioni di durata e temperatura minime adottate comunemente prevedono la permanenza per 30 minuti a una temperatura di 250 °C (2, 11).

Controlli

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

1. Controlli di endotossina

a. **Serie di standard di endotossina.** Preparare quotidianamente una serie fresca di diluizioni seriali dalla soluzione di endotossina base e miscelare in vortex ciascuna diluizione per almeno 30 secondi. Preparare le diluizioni in modo che una serie finale di diluizioni al raddoppio includa la sensibilità (λ) del Pyrotell. Per confermare la sensibilità del Pyrotell si consiglia di utilizzare le concentrazioni 2 λ , λ , 0,5 λ e 0,25 λ . Utilizzare quante meno diluizioni possibili con volumi pipette appropriati per massimizzare l'accuratezza.

b. In alcuni casi i **controlli positivi** possono essere utilizzati in mancanza di una serie di concentrazioni standard. Per informazioni dettagliate, fare riferimento alle linee guida della FDA (1) sotto "Routine Testing of Drugs by the LAL Test" ("Esami di routine dei farmaci mediante test LAL"). La concentrazione del controllo positivo deve essere 2 λ .

c. I **controlli positivi del prodotto** sono controlli di inibizione e sono costituiti da campione di analisi o diluizione del campione di analisi ai quali si aggiunge endotossina standard. La concentrazione finale dell'endotossina aggiunta nel campione di analisi deve essere 2 λ .

2. Controlli negativi

I controlli negativi con LRW devono essere inclusi in ciascun lotto di campioni di analisi analizzati. Durante la convalida del prodotto o il test di inibizione/attivazione (1, 2), il campione di analisi usato per diluire l'endotossina standard viene trattato anche come un controllo negativo.

Preparazione dei campioni di analisi per test di limite o dosaggio

Diluire il campione di analisi alla concentrazione richiesta per effettuare un test di limite (superato/respinto) o per eseguire un dosaggio analizzando una serie di concentrazioni (esempi dei due tipi di test sono inclusi nella sezione "Risultati e interpretazione"). Le diluizioni possono essere eseguite in provette e il volume del test può essere trasferito alle provette di reazione, oppure le diluizioni possono essere effettuate direttamente nelle provette di reazione per lasciare il volume del test, 0,1 mL, in ciascuna provetta. La

diluizione analizzata nel test di limite viene determinata attraverso la sensibilità del Pyrotell ed il limite endotossinico del campione di analisi. Fare riferimento alla sezione "Limiti della procedura" oppure alle direttive della FDA (1) per ottenere spiegazioni e calcolare la Minima Concentrazione Valida (Minimum Valid Concentration o MVC) e la Massima Diluizione Valida (Maximum Valid Dilution o MVD).

Esecuzione del test

Per ottenere risultati soddisfacenti, è necessario adottare una tecnica uniforme.

1. Aggiungere 0,1 mL di Pyrotell ricostituito a ciascuna provetta di reazione contenente 0,1 mL di campione di analisi o controllo. Utilizzare una pipetta graduata (con incrementi di 0,1 mL) o un pipettatore automatico o a dosaggio ripetitivo. Aggiungere prima Pyrotell ai controlli negativi e dalla concentrazione più bassa a quella più alta in ciascuna serie di test in cui il carryover può rappresentare un problema. Si consiglia di utilizzare una pipetta o un puntale nuovi per ciascun prelievo dalla fiala di Pyrotell. Agitare vigorosamente le rastrelliere portaprovette per 20-30 secondi in modo da garantire un'adeguata miscelazione. Se sono presenti solo poche provette, ciascuna di esse può essere miscelata su vortex per 1-2 secondi. Una miscelazione non adeguata è spesso causa di risultati insoddisfacenti dell'analisi.
2. Collocare le provette di reazione in acqua o in bagno a secco a 37 ± 1 °C per 60 ± 2 minuti. La reazione inizia quando il componente LAL viene aggiunto al campione di analisi, tuttavia non avviene alla velocità ottimale finché la miscela non raggiunge i 37 °C. Se si esaminano molti campioni in parallelo, i test devono essere raggruppati in lotti ed iniziati ad intervalli tali da permettere la lettura di ciascuno entro il limite di tempo.

Non disturbare le provette di reazione durante il periodo di incubazione. La reazione che consente la formazione del gel è delicata e può interrompersi in modo irreversibile se le provette vengono manipolate, agitate o subiscono vibrazioni. Non usare bagnomaria con agitazione dell'acqua o altre sorgenti di vibrazioni. Immergere le provette fino a superare il livello della miscela di reazione, ma non inserirle troppo in profondità per evitare di causarne il galleggiamento o lo spostamento all'interno delle rastrelliere.

3. Togliere le provette di reazione e leggere i risultati, una provetta alla volta. Non asciugare le provette mediante strofinamento, né farle urtare contro il lato della rastrelliera durante la rimozione. Invertire la provetta con un movimento uniforme; non fermarsi a metà durante l'inversione, a meno che non sia ovvio che il gel non si sia formato. Il risultato positivo del test è indicato dalla formazione di un gel che non collassa quando la provetta viene invertita.

Risultati e interpretazione

Esempio di serie di endotossina standard

Confermare la sensibilità del Pyrotell e qualificare il laboratorio oppure il tecnico eseguendo il test LAL su una serie conosciuta di concentrazioni di endotossina standard (1, 2) che include la sensibilità indicata sull'etichetta (cioè 2λ , λ , $0,5\lambda$, $0,25\lambda$). In questo esempio la sensibilità (λ) del Pyrotell è di 0,25 EU/mL:

Concentrazione della endotossina	Risultato del test
0,5 EU/mL (2λ)	+
0,25 EU/mL (λ)	+
0,125 EU/mL ($0,5\lambda$)	-
0,06 EU/mL ($0,25\lambda$)	-
LRW (controllo negativo)	-

L'endpoint di questo dosaggio viene definito dalla concentrazione minima di endotossina necessaria per ottenere un risultato positivo del test. La sensibilità indicata sull'etichetta del Pyrotell viene confermata se l'endpoint è λ più o meno una diluizione al raddoppio. In questo esempio la concentrazione di endotossina nell'ultima provetta con risultato positivo nella serie è di 0,25 EU/mL o λ , perciò la sensibilità viene confermata. Il test è valido (la sensibilità è confermata) se l'endpoint è da 0,125 a 0,5 EU/mL (l'errore del metodo). Per mostrare un endpoint di 0,125 EU/mL, il

valore di 0,06 EU/mL deve essere presente nella serie e risultare negativo.

Quando il dosaggio dell'endotossina viene replicato, la sensibilità viene espressa come media geometrica (GM) delle sensibilità individuali:

$$GM = \text{antilogaritmo} ((\Sigma e)/f)$$

in cui Σe = somma dei logaritmi degli endpoint ed f = numero degli endpoint replicati.

Il **controllo negativo** LRW deve dare un risultato negativo del test. Se il controllo negativo coagula, significa che LRW, gli articoli di vetro o il Pyrotell sono contaminati. La miscela deve essere trasparente senza presentare aumenti di viscosità. Particelle o precipitazioni flocculanti indicano che la concentrazione dell'endotossina è inferiore alla sensibilità del Pyrotell.

In assenza delle serie di endotossine (1), è possibile includere con i test un **controllo positivo**. Il controllo positivo a 2λ è il livello 0,5 EU/mL nell'esempio sopra indicato. Se il controllo positivo dà risultato negativo, la sensibilità del Pyrotell è inferiore al valore doppio della sensibilità indicata sull'etichetta e il test del campione di analisi risulta non valido. La perdita della sensibilità potrebbe significare che il Pyrotell è deteriorato, l'endotossina ha perduto concentrazione (spesso a causa dell'adsorbimento sulla superficie del contenitore) oppure il test non è stato condotto in modo adeguato.

Esempio di un test limite (superato/respinto)

È possibile analizzare la concentrazione di un campione con un Pyrotell ad una determinata sensibilità e ottenere dei risultati che indicano se il campione di analisi presenta o meno una quantità superiore o inferiore di endotossina rispetto al suo limite. In questo esempio la concentrazione del campione di analisi è di 1 mg/mL e il limite endotossinico desiderato o predeterminato è di 3 EU/mg (vedere la sezione "Limiti della procedura"). Il limite espresso in EU/mL,

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

è maggiore della sensibilità del Pyrotell, 0,25 EU/mL; di conseguenza il campione di analisi deve essere diluito per poter essere sottoposto al test superato/respinto. Stabilire la diluizione del campione di analisi che indicherà il buon esito del test (superato), ossia $< 3 \text{ EU/mL}$, oppure l'esito negativo (respinto), $\geq 3 \text{ EU/mL}$, dividendo il limite endotossinico misurato in EU/mL per la sensibilità del LAL:

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

Miscelare una parte di campione di analisi con 11 parti di LRW allo scopo di raggiungere una diluizione 1:12 e su questa effettuare il test. Il risultato indicherà se il campione di analisi supera il test al limite di 3 EU/mL. I controlli positivi del prodotto sono inclusi durante il processo di diluizione del campione di analisi per escludere i risultati falsi negativi.

Esempio di dosaggio di un campione di analisi

L'endotossina viene quantificata in un dosaggio trovando l'endpoint in una serie di diluizioni del campione di analisi. Nell'esempio indicato di seguito, il campione di analisi viene diluito con LRW e le diluizioni indicate nella tabella vengono testate; λ è 0,25 EU/mL. I risultati vengono indicati come positivi o negativo.

Diluizione dei campioni di analisi non diluito	Risultato del test
1:2	+
1:4	+
1:8	-
1:16	-
1:32	-
controllo negativo	-

Per calcolare la concentrazione di endotossina nel campione di analisi, moltiplicare la sensibilità del Pyrotell (λ) per il reciproco della diluizione all'endpoint:

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

La concentrazione per dosaggi replicati viene espressa con una media geometrica.

Per escludere i risultati falsi negativi deve essere presente un **controllo positivo del prodotto** (campione di analisi con aggiunta di endotossina standard 2λ) che risulti positivo al test. Se il controllo positivo del prodotto risulta negativo e il controllo positivo del test risulta positivo, il campione di analisi interferisce (inibisce) con il test LAL. Il campione di analisi deve essere rianalizzato a una diluizione maggiore (non superare la Massima Diluizione Valida (MVD)); vedere la sezione "Limiti della procedura").

Limiti della procedura

La procedura è limitata dalla capacità del campione di analisi di inibire o attivare il test LAL. Se la procedura non può essere convalidata (1, 2) a una concentrazione del campione di analisi superiore alla minima concentrazione valida (MVC), non è possibile usare il test LAL al posto del test dei pirogeni USP. La MVC è calcolata come segue:

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

in cui λ è espresso in EU/mL, la dose del campione di analisi 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 di analisi contenente l'MVC (1). Viene calcolata dividendo la concentrazione iniziale del campione di analisi per l'MVC.

Il limite di tolleranza endotossinica (1) 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 medicali è espresso per mL di un volume di estrazione o di risciacquo ottenuto nel modo descritto nelle linee guida della FDA (1). Per i dispositivi a contatto con il liquido cerebrospinale, il limite è di 0,06 EU/mL; per i dispositivi non a contatto con questo liquido, il limite è di 0,5 EU/mL. Il limite per i presidi liquidi è lo stesso che per i farmaci.

La tripsina genererà un risultato falso positivo se prima dell'analisi non viene denaturata mediante trattamento termico. Materiali quali sangue, siero e plasma, devono essere trattati al fine di inattivare gli inibitori prima di eseguire il test (12).

Valori attesi

L'endotossina può essere quantificata se la concentrazione è maggiore o uguale alla sensibilità del Pyrotell. 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.

Caratteristiche prestazionali specifiche

L'errore nel metodo di gelificazione è di più o meno una diluizione al raddoppio dell'endpoint del dosaggio.

Bibliografia

1. Bacterial Endotoxins Test, Current USP.
2. Howell, W. H. 1885. Observations upon the chemical composition and coagulation of the blood of *Limulus polyphemus*, *Callinectes hastatus*, and *Cucumaria* sp. Johns Hopkins University Circular 43:4-5.
3. Bang, F. B. 1953. The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. Biol Bull. (Woods Hole, MA) 105:361-362.

4. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. A description of cellular coagulation in the *Limulus*. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:337-345.
5. Levin, J., and F. B. Bang. 1964. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. Bull. Johns Hopkins Hosp. 115:265-274.
6. Levin, J., and F. B. Bang. 1968. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb. Diath. Haemorrh. 19:186-197.
7. Novitsky, T. J. 1984. Discovery to Commercialization: The blood of the horseshoe crab. Oceanus 27:13-18.
8. 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.
9. Tsujii, K. and S. J. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of lipopolysaccharide: Dry-heat destruction kinetics. Appl. Environ. Microbiol. 36:715.
10. 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.
11. 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.

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 Pyrotell. I prodotti le cui prestazioni non sono conformi alle specifiche tecniche verranno sostituiti, tuttavia l'azienda deve essere avvisata prima di effettuare la restituzione dei prodotti.